

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTÀ DI AGRARIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO, DELLA PIANTA E
DELL'AMBIENTE**

**CORSO DI DOTTORATO IN AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA
XVIII CICLO**

**Caratterizzazione di ibridi di patata
ottenuti mediante manipolazioni
genomiche**

Dr. Salvatore Alberino

RELATORE

Ch.mo Prof.

Luigi Frusciante

COORDINATORE

Ch.mo Prof.

Domenico Carputo

COORDINATORE

Ch.mo Prof.

Antonio Violante

Anno Accademico 2004/2005

1. Prefazione

Sperando che questo lavoro possa fornire un contributo volto all'apprendimento degli aspetti ancora oscuri alla mente umana di "Madre Natura", dedico questo lavoro a tutte le persone che mi hanno aiutato e permesso di seguire questo percorso formativo. A mio padre, che dopo tanto sudore non ha potuto raccogliere tutti i frutti del suo lavoro, dico:

"Se oggi tuo figlio ha completato questo percorso, è soprattutto merito dei tuoi insegnamenti. Mi hai insegnato valori come l'umiltà e l'onestà".

Ringrazio i professori Luigi Frusciante e Domenico Carputo per aver creduto in me e per avermi concesso la possibilità di conoscere il mondo della ricerca scientifica: un mondo tanto misterioso quanto affascinante.

2. Indice

1. PREFAZIONE	1-2
2. INDICE	2-4
3. INTRODUZIONE	3-8
3.1. GENETICA E MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA PATATA	3-11
3.2. IBRIDAZIONE SESSUALE INTERSPECIFICA	3-15
3.2.1. SPECIE COMPATIBILI CON APLOIDI DI <i>S. TUBEROSUM</i>	3-19
3.2.2. SPECIE INCOMPATIBILI CON APLOIDI DI <i>S. TUBEROSUM</i>	3-22
3.3. SELEZIONE ASSISTITA	3-24
3.4. OBIETTIVI DELLA TESI	3-26
4. MATERIALI E METODI	4-28
4.1. MATERIALE VEGETALE	4-29
4.2. METODI	4-30
4.2.1. VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE	4-30
4.3. VALUTAZIONE DEL CONTENUTO E DEL TRASPORTO DI VITAMINA C	4-33
4.4. VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA ALL'APPASSIMENTO BATTERICO (<i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>)	4-36
4.5. VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA AL MARCIUME MOLLE DEI TUBERI (<i>ERWINIA CAROTOVORA</i> SSP. <i>CAROTOVORA</i>)	4-39
4.6. VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA ALLA PERONOSPORA (<i>PHYTOPHTORA</i> INFESTANS)	4-41
4.7 ANALISI CON MARCATORI AFLP DEGLI IBRIDI <i>S. TUBEROSUM</i> - <i>S. COMMERSONII</i>	4-42
4.8 ANALISI AFLP	4-43
4.8.1 DIGESTIONE E LIGAZIONE DEL DNA	4-44
4.8.2 AMPLIFICAZIONE PRE-SELETTIVA	4-45

4.8.3	AMPLIFICAZIONE SELETTIVA	4-45
4.8.4	SEPARAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA AMPLIFICATI SU GEL DI ACRILAMMIDE	4-47
4.9	ANALISI STATISTICHE E CALCOLO DELL'INDICE DI VALUTAZIONE	4-47
5.	RISULTATI	5-50
5.1	PRODUZIONE DI TUBERI	5-51
5.2	VALUTAZIONE FENOTIPICA DEI TUBERI	5-61
5.3	VALUTAZIONE DEL PESO SPECIFICO DEI TUBERI	5-63
5.4	VALUTAZIONE DEL CONTENUTO E DEL TRASPORTO DI VITAMINA C	5-64
5.5	VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA ALLA PERONOSPORA	5-68
5.6	VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA AL MARCIUME MOLLE DEI TUBERI	5-70
5.7	VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA ALL'AVVIZZIMENTO BATTERICO	5-73
5.8	ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI	5-78
5.9	ANALISI AFLP E INDICE DI VALUTAZIONE	5-85
6.	DISCUSSIONE	6-88
7.	CONCLUSIONI	7-109
8.	BIBLIOGRAFIA	8-121

Caratterizzazione di ibridi di patata ottenuti mediante manipolazioni genomiche

3. Introduzione

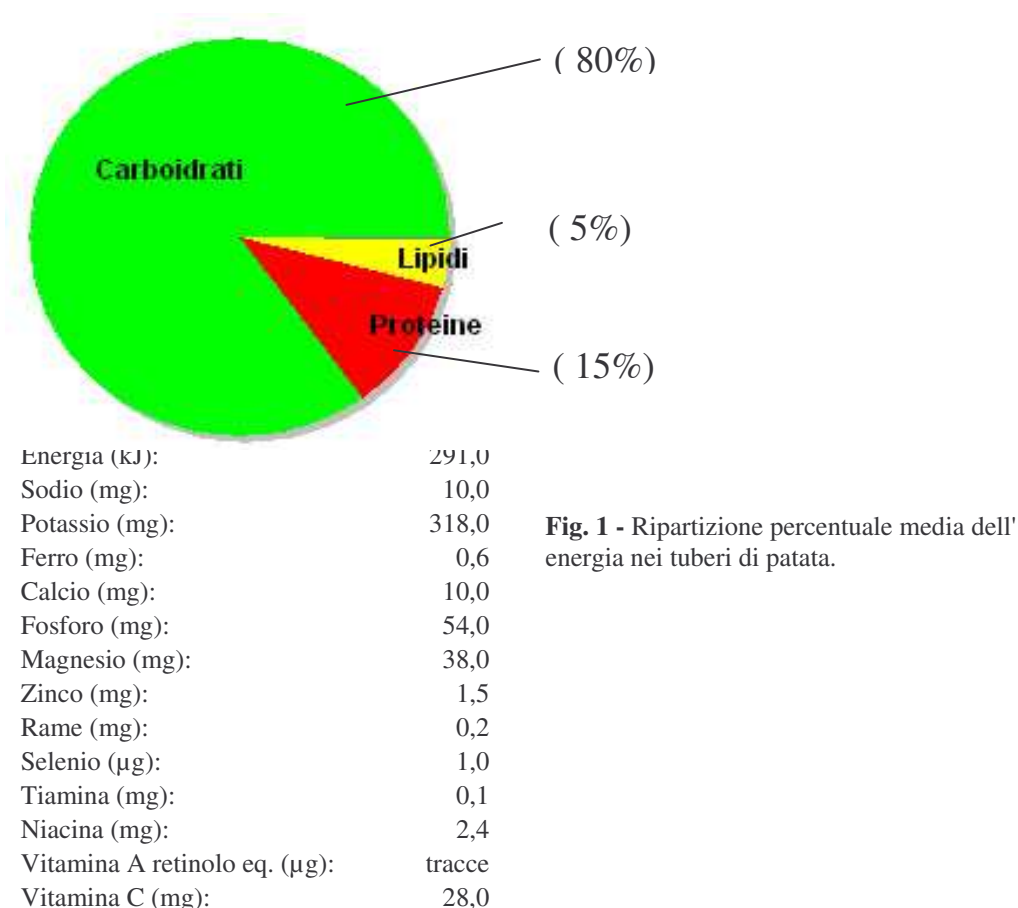
La patata (*Solanum tuberosum* L.) è una specie molto importante per l'alimentazione umana. I suoi tuberi sono una importante fonte di energia, rappresentando una delle cinque principali specie vegetali ad uso alimentare nel mondo (Ortiz 1998). In tabella 1 viene riportata la composizione chimica media di un tubero di patata ed in figura 1 la ripartizione percentuale media dell'energia da esso posseduta.

L'Italia ha caratteristiche pedo-climatiche che consentono di individuare, lungo tutta la penisola, aree vocate per la pataticoltura, con produzione di tuberi pressoché ininterrotta lungo tutto il corso dell'anno. La superficie destinata a tale coltivazione nel 2004 è stata di circa 81000 ettari in Italia e 2.3 milioni di ettari nell'Unione Europea (FAOSTAT, 2005). Nonostante la superficie coltivata a patata sia in costante progressivo calo, la produzione media italiana negli ultimi anni si è attestata intorno a 2 milioni di tonnellate per anno; ciò è stato reso possibile grazie al continuo incremento delle produzioni unitarie.

L'offerta nazionale di prodotto destinato al consumo fresco si compone di tre raccolti annui, con coltivazione da novembre a maggio (patata precoce), oppure da aprile a settembre (patata comune) o ancora da agosto a dicembre (patata bisestile).

Le rese produttive nella zona mediterranea sono generalmente più basse quando confrontate con quelle ottenute nel nord Europa. Ciò

è principalmente dovuto al fatto che le caratteristiche ambientali ed agro-economiche qui presenti sono differenti da quelle dei paesi nordici, in cui la maggior parte delle varietà coltivate è stata sviluppata (Frusciante *et al.* 1999); inoltre, l'elenco delle varietà disponibili è relativamente ridotto e alcune di esse sono di vecchia costituzione. L'ottenimento di nuove varietà di patata è un'operazione molto complessa a causa dell'alto numero di caratteristiche che devono essere considerate. Secondo Ross (1986), infatti, al fine di rendere un nuovo genotipo commercialmente accettabile, bisogna considerare più di 50 caratteristiche positive (comprehensive di produzione, resistenze e qualità).



La patata presenta una serie di caratteristiche genetiche che offrono enormi potenzialità al lavoro di miglioramento genetico. Infatti, risponde bene a numerose tecniche innovative come le manipolazioni genomiche e cromosomiche; presenta, inoltre, un patrimonio genetico di inestimabile valore nelle specie selvatiche ad essa vicine che rendono molto efficienti gli schemi basati sull'ibridazione interspecifica. Inoltre, essendo una specie a propagazione vegetativa, consente di “fissare” immediatamente un genotipo che presenta combinazioni di caratteri particolarmente favorevoli.

3.1. Genetica e miglioramento genetico della patata

Le specie di patata che producono tuberi fanno parte della sezione Petota, subsezione Potatoe. Questa comprende 19 serie, tra cui la Tuberosa, la Bulbocastana, la Acaulia, la Demissa. Nel loro insieme le specie di patata formano una serie poliploide con corredo cromosomico di base (x) di 12. La maggior parte di queste specie, circa il 70%, è diploide ($2n=2x=24$), mentre il restante 30% è costituito da specie triploidi ($2n=3x=36$), tetraploidi ($2n=4x=48$), pentaploidi ($2n=5x=60$) ed esaploidi ($2n=6x=72$). *S. tuberosum* è la patata coltivata in tutto il mondo, in quanto ben si adattata a condizioni di giorno lungo. Ad essere coltivate non sono solo le specie tetraploidi; nel sud America ci sono anche alcune specie diploidi (*S. phureja*, *S. stenotomum*), triploidi (*S. chaucha* e *S. juzepczukii*) e

pentaploidi (*S. curtilobum*). Oltre alle specie coltivate, sono presenti numerose specie selvatiche (oltre 200) che producono tuberi e che crescono in una variabilità di habitat estremamente ampia, che va dalla parte meridionale degli Stati Uniti fino al sud del Cile.

La maggior parte delle specie poliploidi di patata presenta un corredo cromosomico somatico di 48 cromosomi ed eredità tetrasomica (tetraploidi tetrasomici); sono presenti anche alcune specie poliploidi ad eredità disomica, quali *S. acaule* ($2n=48$) e *S. oplocense* ($2n=72$), definiti pertanto poliploidi disomici. *S. tuberosum* è un tetraploide tetrasomico in cui, ad ogni locus, sono possibili cinque genotipi: AAAA (quadruplex), AAAa (triplex), AAaa (duplex), Aaaa (simplex) e aaaa (nulliplex). Queste combinazioni genotipiche sono il prodotto della fusione di tre tipi diversi di gameti (AA, Aa, aa), e pertanto i rapporti fenotipici attesi dipendono dagli eventi citologici che portano alla formazione dei gameti.

Altra importante caratteristica genetica della patata coltivata tetraploide è rappresentata dalla modalità di segregazione, che può essere sia cromosomica che cromatidica. Quest'ultima fa sì che nello stesso gamete possano essere presenti due cromatidi fratelli (doppia riduzione). Tale evento si verifica quando sono presenti appaiamenti a quadrivalenti e c'è crossing over tra il locus e il centromero.

Il miglioramento genetico della patata è caratterizzato da alcuni aspetti peculiari della specie. L'ampio ricorso alla propagazione vegetativa fa sì che i genotipi su cui ha agito una pressione selettiva naturale e/o artificiale siano immediatamente "fissati" anche nei loci eterozigoti. Inoltre, dato il limitato numero di genotipi originariamente

introdotti in Europa e l'elevata sterilità maschile, nei primi programmi di miglioramento genetico sono stati usati, come parentali impollinatori, solo pochi genotipi. Questo ha comportato il progressivo impoverimento della variabilità genetica di *Solanum tuberosum*.

Come per altre specie vegetali, anche in patata i caratteri possono presentare un controllo poligenico o monogenico. Fra i primi vanno annoverati molti caratteri agronomici quali produzione di tuberi, contenuto in amido, resistenza a stress (ad esempio a peronospora), peso specifico dei tuberi, dormienza, contenuto in glicoalcaloidi. Alcuni esempi di caratteri a controllo monogenico sono la resistenza a nematodi e la produzione di gameti $2n$. Da non trascurare che il fenotipo è sempre il risultato fra l'interazione genotipo-ambiente, che ovviamente ostacola l'attività di miglioramento genetico e gli studi sul controllo genetico dei caratteri di interesse.

Nonostante le difficoltà sopra citate, numerose ricerche hanno contribuito a chiarire importanti aspetti legati alla genetica ed al miglioramento genetico di questa coltura. Vari autori hanno dimostrato che esistono alti valori di ereditabilità per caratteri quali contenuto in sostanza secca, contenuto in amido, forma del tubero e lunghezza degli stoloni (Ortiz 1998). Altri studi hanno dimostrato che la varianza genetica per il carattere produzione è principalmente basata su effetti non additivi di geni e comprende, quindi, interazioni intra-alleliche (dominanza) ed inter-alleliche (epistasia). Pertanto, il massimo di eterosi si ottiene quando quattro alleli diversi sono

presenti in ciascun locus (tetrallelismo). Buso *et al.* (1999a) hanno localizzato in prossimità del centromero la maggior parte dei geni che controllano il carattere “produzione di tuberi”.

Gli studi genetici effettuati hanno messo in evidenza che l’ottenimento di progenie altamente eterotiche è possibile quando i genitori: a) hanno un ridotto coefficiente di inbreeding; b) hanno massima diversità allelica nei loci che controllano uno specifico carattere; c) appartengono a pool genetici differenti, incrementando ulteriormente le possibilità di diversità allelica.

Le caratteristiche genetiche e botaniche della patata fanno sì che questa coltura sia adatta a tutte le strategie del miglioramento genetico convenzionali ed innovative a disposizione dei “breeder”. La patata, infatti, è diventata una coltura modello per le applicazioni di tecniche di colture *in vitro* (fusione di protoplasti, trasformazione genetica, coltura di antere), biologia molecolare, ingegneria genomica e, ovviamente, ibridazione sessuale. Quest’ultima è ancora la strategia più diffusa per l’ampliamento della base genetica dei genotipi coltivati. Essa può basarsi sull’uso sia di varietà/cloni di *S. tuberosum*, sia di specie selvatiche di *Solanum*.

Tradizionalmente l’attività di miglioramento genetico si basa sulla selezione di cloni da incroci $4x \times 4x$ fra cultivar/cloni tetraploidi (Bradshaw *et al.* 1994). La strategia consiste nello scegliere i parentali in funzione dei caratteri che si desiderano apportare alla progenie, effettuare gli incroci, allevare i genotipi derivanti da essi e poi, mediante la selezione fenotipica ricorrente, individuare i cloni agronomicamente superiori (Frusciante *et al.* 1999). Una corretta

selezione fenotipica multicaratteriale va effettuata su parcelle ripetute. Al fine d'incrementare l'efficienza della selezione, è da preferire una selezione negativa poco spinta nei primi anni; questo consente di evitare che eventuali effetti negativi del singolo anno si ripercuotano negativamente sull'efficienza dell'esperimento (Tai *et al.* 1984; Tarn *et al.* 1992; Frusciante *et al.* 1999) . Fra i caratteri d'interesse per la selezione, particolare importanza rivestono i caratteri morfologici (profondità occhi, lunghezza stoloni, morfologia tubero) e produttivi (numero tuberi e peso della produzione) e qualitativi (contenuto in vitamina C e sostanza secca); importanti sono anche eventuali caratteri di resistenza a stress biotici e/o biotici.

Mediante il miglioramento genetico a livello tetraploide sono necessari circa dieci anni affinché un programma di miglioramento genetico possa dare un clone da iscrivere al registro delle varietà.

3.2. Ibridazione sessuale interspecifica

Una strategia geneticamente più semplice per il miglioramento genetico della patata prevede l'uso di germoplasma diploide ($2n=2x=24$) come fonte di variabilità genetica (e quindi di caratteri utili) e degli aploidi ($2n=2x=24$) di *S. tuberosum* per “catturare” tale diversità genica. Nelle numerose specie selvatiche di patata è possibile reperire molti caratteri di interesse per la costituzione di una nuova varietà: elevato contenuto in sostanza secca, basso contenuto di zuccheri riduttori, resistenza a stress biotici (funghi, batteri, insetti e nematodi) e abiotici (in particolare freddo e siccità) e molti altri

ancora. Altro vantaggio nell'uso delle specie selvatiche per i miglioratori deriva dal fatto che la diversità allelica apportata dalle specie selvatiche determina un aumento delle interazioni alleliche, che a loro volta migliorano i caratteri quantitativi.

Nell'“Inventory of tuber-bearing *Solanum* species”, (Hanneman *et al.* 1986) sono state riportate le caratteristiche di oltre 150 specie selvatiche di *Solanum*. La maggior parte di esse è portatrice di resistenze multiple. Per esempio *S. commersonii* ($2n=2x=24$) è resistente al freddo, a *Verticillium spp.*, a diversi nematodi fra cui *Globodera rostochiensis* e a *Corynebacterium sepedonicum*; *S. jamesii* ($2n=2x=24$) è invece resistente al virus Y della patata, a *Myzus persicae* e a *Phytophthora infestans*.

Le specie diploidi sono generalmente autoincompatibili mentre le specie tetraploidi ed esaploidi si autofecondano, pur con problemi di depressione da inbreeding dopo alcune generazioni di autofecondazione. Le specie selvatiche, infine, possono generalmente interincrociarsi, dando vita ad ibridi fertili. Ciò è essenzialmente dovuto al fatto che i genomi delle specie di *Solanum* sono molto poco differenziati, e quindi c'è la possibilità di appaiamento tra cromosomi omologhi (Camadro *et al.* 2004).

Le progenie diploidi derivanti dagli incroci interspecifici tra aploidi di *S. tuberosum* e specie selvatiche diploidi presentano un'eredità disomica che, rispetto a quella tetrasomica, facilita enormemente il lavoro di selezione degli ibridi interessanti per caratteristiche agronomiche e per la produzione di gameti $2n$. Quest'ultima caratteristica è indispensabile per il ripristino della

condizione tetraploide, che si verifica in seguito all'impiego di schemi di poliploidizzazione sessuale che prevedono l'incrocio con cultivar/cloni tetraploidi.

La produzione di gameti $2n$ (gameti con il corredo cromosomico non ridotto) é un fenomeno comune ad un elevato numero di specie di *Solanum* coltivate e selvatiche. Questi sono un importante strumento per i miglioratori e sono usati non solo in patata ma anche in erba medica, trifoglio, banana, rosa, avena (Bretagnolle *et al.* 1995).

I gameti $2n$ sono il frutto di anomalie meiotiche che alterano il normale svolgimento di fasi cruciali della meiosi quali l'appaiamento dei cromosomi omologhi, la corretta formazione dei fusi e la citochinesi. Fra le mutazioni meiotiche che hanno effetto sulla megasporogenesi, l'omissione della seconda divisione meiotica "*os*" é quella più comune in patata (Werner *et al.* 1990). In presenza di "*os*", vengono prodotte due megaspore $2n$ di cui una degenera, mentre l'altra produce la spora funzionale. Un'altra variante meiotica che porta alla produzione di ovocellule $2n$ è determinata da anomalie della citochinesi a seguito della seconda divisione con conseguente fusione dei prodotti nucleari di questa divisione. Entrambe anomalie sono controllate da singoli geni recessivi (Werner *et al.* 1990).

Molto studiate sono state anche le anomalie meiotiche ed il controllo genetico per la produzione del polline $2n$. La mutazione meiotica più diffusa legata alla produzione di polline $2n$ è la formazione dei fusi paralleli "*ps*" durante metafase II della microsporogenesi. In presenza di "*ps*" il prodotto finale della meiosi è

una diade composta da due microspore $2n$ (Mok *et al.* 1975). Anche questa mutazione è monogenica e recessiva.

Una caratteristica comune a tutte le mutazioni meiotiche descritte è che esse presentano una penetranza incompleta ed una espressività variabile. È stato anche osservato che le condizioni ambientali hanno un effetto considerevole sulla frequenza di produzione di gameti $2n$ (Buso *et al.* 1999b), sebbene non sia stato ancora possibile determinare uno specifico fattore ambientale che ne influenzi la frequenza.

Dal punto di vista del miglioramento genetico i gameti $2n$ sono molto importanti non soltanto perché collegano fra di loro differenti livelli di ploidia, ma anche perché trasmettono elevate quote di eterozigosi ed epistasia da un parentale alla propria progenie (Peloquin *et al.* 1999).

Nei programmi di miglioramento genetico della patata basati sull'ibridazione interspecifica è fondamentale conoscere il modello “Endosperm Balance Number” (EBN), in quanto con esso si riesce a prevedere l'esito positivo o negativo dell'incrocio tra due genotipi di patata appartenenti a specie diverse, o aventi livelli di ploidia diversi (Johnston *et al.* 1980). L'EBN è un numero empirico assegnato ad ogni specie di *Solanum*, che rappresenta la “effettiva ploidia” delle specie. Tale numero non è necessariamente correlato alla ploidia cromosomica e varia da 1 (*S. commersonii*, *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*) a 4 (*S. tuberosum*, *S. albicans*, *S. brachycarpum*). Condizione necessaria per l'esito positivo dell'incrocio è il pari valore di EBN dei parentali, ossia che il rapporto tra EBN materno e paterno

nell'endosperma sia di 2:1. Deviazioni da detto rapporto possono determinare squilibri citoplasmatici e la degenerazione dell'endosperma, con conseguente aborto dell'embrione.

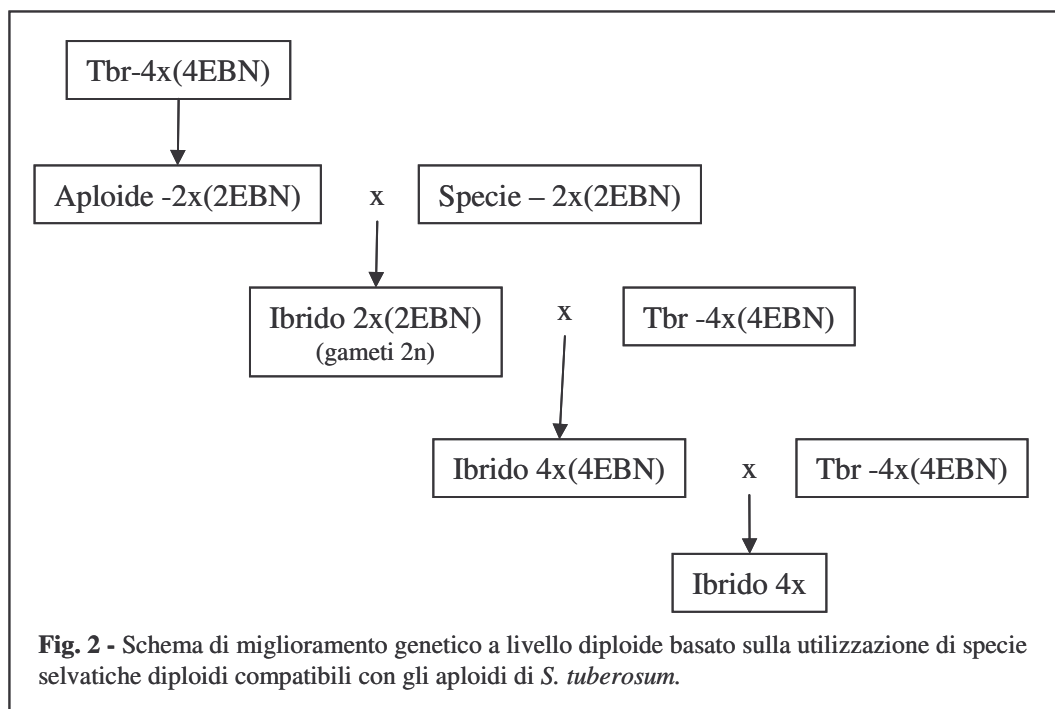
Studi genetici hanno evidenziato che in *Solanum* l'EBN è sotto il controllo di tre loci con effetto additivo e con alleli in omozigosi (Ehlenfeld *et al.* 1988). Gli studi di Johnston e Hanneman (1995) in *Datura* e *Solanum*, hanno confermato che l'EBN è controllato da più geni localizzati su cromosomi differenti. È stato dimostrato che uno sbilanciamento del rapporto 2:1 può essere tollerato, e che un eccesso in EBN materno è meglio tollerato di un eccesso di EBN paterno.

Il miglioramento genetico della patata mediante ibridazione interspecifica è favorito da alcune caratteristiche peculiari della specie. Fra le più importanti ricordiamo la relativa facilità nel ottenere aploidi ($2n=2x=24$) di *S. tuberosum* mediante incroci con cloni di *S. phureja*; la disponibilità di numerosissime specie selvatiche diploidi; la possibilità di ottenere ibridi interspecifici fertili, in quanto le varie specie di *Solanum* presentano genomi molto simili fra di loro. La varianza genetica di molti caratteri, infine, è di natura non additiva e quindi la loro espressione potrebbe avvantaggiarsi dall'uso dei gameti $2n$. Le strategie adottabili nell'uso delle specie selvatiche variano in funzione della compatibilità con gli aploidi di *S. tuberosum*.

3.2.1. Specie compatibili con aploidi di *S. tuberosum*

Numerose specie selvatiche sono $2x(2EBN)$. Per la loro utilizzazione nei programmi di ibridazione interspecifica è necessario

produrre e selezionare aploidi ($2n=2x=24$, 2 EBN) di varietà coltivate. Essi sono poi incrociati con le specie selvatiche $2x(2EBN)$ compatibili. Successivamente gli ibridi interspecifici prodotti vengono caratterizzati e selezionati per numerosi parametri (es. produzione, resistenza a stress, qualità, precocità) ed anche per la produzione di gameti $2n$. Quest'ultima condizione è indispensabile per il ripristino della condizione tetraploide attraverso programmi di poliploidizzazione sessuale. Ripristinata la ploidia tipica, risulta poi indispensabile effettuare reincroci finalizzati all'eliminazione dei caratteri indesiderati derivanti dall'apporto di genoma selvatico (fig. 2).



Gli schemi di poliploidizzazione da adottare variano in funzione della tipologia dei gameti $2n$ a disposizione; si può avere

poliploidizzazione sessuale unilaterale basata su incroci $4x \times 2x$ o $2x \times 4x$ (a seconda se si ha la produzione polline o ovocellule $2n$); oppure poliploidizzazione sessuale bilaterale, quindi basata su incroci $2x \times 2x$ (in presenza sia di polline che di ovocellule $2n$).

Dato l'alto livello di interazioni intra- e inter-locus trasmesse dal polline $2n$ e l'ampia diffusione di polline $2n$ in *Solanum*, generalmente gli schemi di poliploidizzazione sessuale più utilizzati si basano su incroci $4x \times 2x$ (Watanabe *et al.* 1992; Carputo *et al.* 1994; Ortiz *et al.* 1997; Buso *et al.* 1999c). La presenza di numerosi geni utili nel germoplasma selvatico diploide rappresenta un altro fattore a favore della utilizzazione della poliploidizzazione sessuale per l'introggressione di tali geni nella patata coltivata. Presso numerosi centri di ricerca (es. l'International Potato Center di Lima, il Centro Ricerche di Młochów in Polonia) ibridi diploidi interspecifici che producono gameti $2n$ vengono selezionati ed utilizzati dai miglioratori per trasferire caratteri importanti da specie selvatiche a *S. tuberosum*. Numerosi sono gli esempi riportati in letteratura sull'uso del miglioramento a livello diploide e della poliploidizzazione sessuale per trasferire caratteri di resistenza. Watanabe *et al.* (1992) per esempio, hanno trasferito la resistenza a *Ralstonia solanacearum* da *S. chacoense* e *S. sparsipilum* a *S. tuberosum*. Ortiz *et al.* (1997) sono riusciti a trasmettere la resistenza a *Globodera pallida* da *S. vernei*, *S. sparsipilum* e *S. andigena* in cloni tetraploidi di *S. tuberosum* utilizzando polline $2n$. Carputo *et al.* (2002) hanno trasferito la resistenza a *Erwinia carotovora* di *S. tarijense* a *S. tuberosum*

attraverso incroci $2x \times 4x$. Numerosi altri esempi sono riportati da Ortiz (1998).

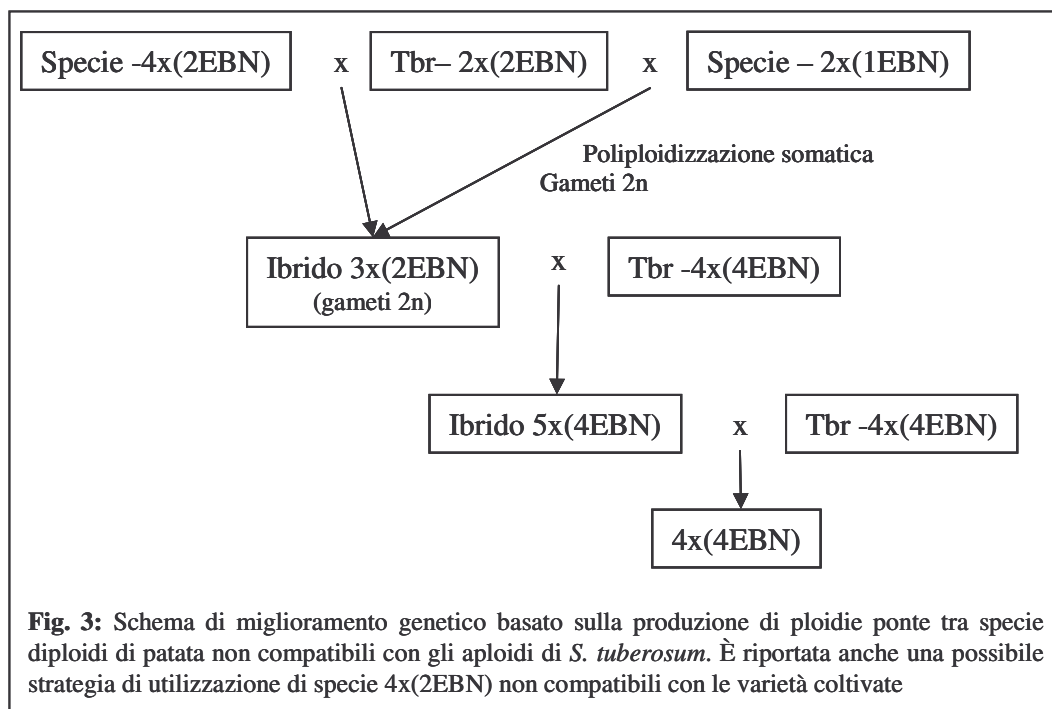
3.2.2. Specie incompatibili con aploidi di *S. tuberosum*

La presenza di barriere di incompatibilità dovute a differenze di EBN tra specie selvatiche e genotipi di *S. tuberosum* impediscono spesso l'ibridazione interspecifica. Ciò induce i miglioratori ad utilizzare alternative alla poliploidizzazione sessuale unilaterale. Le possibili soluzioni sono varie, ma tutte di più difficile attuazione rispetto agli schemi di poliploidizzazione prima trattati. Fra le più diffuse ricordiamo la strategia delle ploidie ponti. Mediante la sua applicazione, vengono prodotti ploidie ponti triploidi (F_1) e pentaploidi (BC_1). Queste consentono di superare le barriere dovute a differenze di EBN tra una specie $2x(1EBN)$ e aploidi di varietà coltivate ($2EBN$).

Le ploidie ponte possono essere prodotte sia mediante incroci fra specie con pari ploidia ma differente EBN, laddove il parentale con EBN più basso produce però gameti $2n$; sia mediante incroci con specie a differente ploidia ma con simile EBN. Lo schema delle ploidie ponti è sintetizzato nella figura 3.

Nel caso di utilizzazione di specie $2x(1EBN)$, esso prevede dapprima la produzione di ibridi triploidi attraverso incroci tra aploidi di *S. tuberosum* ed un genotipo di specie selvatica con corredo cromosomico (ed EBN) raddoppiato o che produce gameti $2n$; successivamente sono generati ibridi pentaploidi ed infine, come già

per gli schemi di poliploidizzazione sessuale, viene effettuata una serie di reincroci finalizzati all'eliminazione dei caratteri "selvatici" indesiderati. Il successo di questo tipo di approccio, ampiamente documentato in letteratura, deriva dalla possibilità di introgredire diversità allelica da specie a EBN=1 in *S. tuberosum*.



Per trasferire geni di resistenza da specie 2x(1EBN) e 4x(2EBN) nella patata coltivata tetraploide, ibridi ponte triploidi sono stati ottenuti tra la specie 2x(1EBN) *S. brevidens* e 2x(2EBN) *S. chacoense* (Ehlenfeldt *et al.* 1984), tra le specie 4x(2EBN) della Serie Longipedicellata e aploidi di *S. tuberosum* (Adiwilaga *et al.* 1991), tra le specie 2x(1EBN) *S. circaeifolium* e *S. commersonii* e aploidi di *S. tuberosum* (Carputo *et al.* 1997; Louwes *et al.* 1992). Nella utilizzazione delle specie 4x(2EBN) è anche possibile ottenere ploidie

ponte F_1 esaploidi. Queste vengono generate da incroci $4x(2EBN) \times 4x(4EBN)$ se la specie $4x(2EBN)$ produce gameti $2n$. Le progenie F_1 esaploidi hanno un $EBN=4$, e pertanto risultano facilmente incrociabili con *S. tuberosum*. Proprio attraverso questa metodologia la resistenza a virus di *S. acaule* e la resistenza ai nematodi galligeni di *S. fendleri* è stata trasferita in *S. tuberosum* (Camadro *et al.* 1990; Janssen *et al.* 1997).

3.3. Selezione assistita

Anche l'attività di miglioramento genetico basata sull'ibridazione interspecifica ha saputo trovare vantaggi dallo sviluppo e applicazione di nuove tecnologie molecolari. Con lo sviluppo di marcatori molecolari associati ai geni di interesse è possibile procedere in modo veloce, precoce e pratico alla selezione positiva dei genotipi soddisfacenti le esigenze del miglioramento genetico. Qualora siano disponibili marcatori molecolari associati a geni interessanti, è infatti possibile valutare le piante anche in età molto giovanile, in spazi molto ristretti e senza lo svolgimento di test di resistenza ai patogeni. Altro vantaggio è che mediante la selezione assistita è possibile superare i problemi derivanti dalla individuazione dei falsi positivi e/o falsi negativi dovuti all'influenza dell'ambiente, azzerando così quasi del tutto il margine d'errore. Tali vantaggi sono ancora più evidenti quando si tratta di selezionare per caratteri produttivi e di qualità dei tuberi, laddove è necessario valutare un numero molto elevato di genotipi.

In patata sono già riportati casi in cui tale selezione positiva assistita da marcatori molecolari è stata applicata con successo (Barone 2004). I marcatori molecolari maggiormente utilizzati ai fini della selezione assistita, sono RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SSR (Simple Sequence Repeats). Marcatori RFLP strettamente associati ad un gene di resistenza al virus Y della patata sono stati utilizzati per selezionare cloni resistenti nella progenie fra genotipi diploidi e tetraploidi di *Solanum* (Hamalainen *et al.* 1997). Anche caratteri più complessi, come la resistenza a *Phytophthora infestans*, sono stati proficuamente studiati mediante marcatori molecolari. Oberhagemann *et al.* (1999) hanno proposto l'uso di marcatori molecolari per la selezione assistita di genotipi resistenti a peronospora. Recentemente è stato mappato il gene *RP11*, localizzato sul cromosoma VII, che conferisce resistenza a tale patogeno (Kuhl *et al.* 2001). Anche la resistenza ai virus, patogeni molto dannosi e deleteri per la pataticoltura, è stata investigata. Marczewski *et al.* (2002) hanno mappato il gene *Ns*, che conferisce resistenza al PSV, ed è localizzato sul cromosoma VIII.

Altro aspetto fondamentale dell'uso dei marcatori molecolari nella selezione assistita riguarda la possibilità di eliminare i caratteri non desiderati (selezione negativa assistita), particolarmente utile nei programmi di miglioramento genetico che prevedono l'uso di specie selvatiche. È risaputo infatti che tali specie apportano numerosi caratteri indesiderati. La messa a punto di marcatori molecolari specie-specifici e la loro applicazione ad una popolazione ibrida, che

presenta caratteri d'interesse, permette la selezione assistita negativa. Essa consente di stimare il contenuto di genoma selvatico dei genotipi di interesse e quindi di eliminare quelli con valori più alti (Tanksley *et al.* 1989). Marcatori molecolari sono stati utilizzati per aumentare l'efficienza di tale selezione negativa nei programma di reincrocio finalizzato a trasferire geni utili dalla specie selvatica *S. commersonii* a genotipi coltivati di *S. tuberosum* (Iovene *et al.* 2004).

È stato dimostrato come tale selezione sia altamente efficace anche per una specie poliploide ad eredità tetrasomica con la patata oltre che per specie modello diploidi quali il pomodoro.

3.4. Obiettivi della tesi

Data la molteplicità di usi della patata, gli obiettivi del miglioramento genetico sono numerosi e spesso contrastanti tra loro. Essi possono essere distinti in tre grandi gruppi:

- Caratteri legati alla produzione
- Caratteri legati alla resistenza a stress biotici ed abiotici.
- Caratteri legati alla qualità del prodotto

Da alcuni anni obiettivi e problematiche stanno cambiando, soprattutto perché crescono le preoccupazioni per l'ambiente mentre si riducono quelle per la produttività. Inoltre, il sistema pataticolo italiano è sempre più connesso con quello degli altri Paesi e l'esigenza di globalizzazione dei mercati contribuisce a rendere più complessi gli obiettivi del miglioramento genetico.

Gli obiettivi del presente lavoro sono stati lo studio, la valutazione e la selezione di ibridi ottenuti mediante due diversi schemi di ingegneria genomica messi a punto per l'introggressione di variabilità allelica e geni utili delle specie selvatiche 2x(2EBN) *S. phureja* e 2x(1EBN) *S. commersonii*. In particolare gli obiettivi hanno riguardato:

- Valutazione agronomica di ibridi *S. phureja*-*S. tuberosum* e *S. commersonii*-*S. tuberosum* per la selezione di genotipi superiori, determinazione di caratteristiche produttive e morfologiche (lunghezza stoloni, colore e profondità occhi, forma tubero, colore buccia e colore polpa).
- Valutazione del materiale vegetale in studio per resistenza ad alcuni delle più importanti batteriosi: l'appassimento batterico (*Ralstonia solanacearum*) e il marciume molle dei tuberi (*Erwinia carotovora*).

Messa a punto di metodi di selezione assistita efficiente attraverso marcatori molecolari AFLP.

4. Materiali e metodi

4.1. *Materiale vegetale*

Il materiale vegetale oggetto di studio era già disponibile presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente della Facoltà di Agraria di Portici Università degli Studi di Napoli "Federico II". Tale materiale (figura 4) , prodotto durante precedenti programmi di miglioramento genetico della patata svolti presso il suddetto Dipartimento, includeva:

- 151 ibridi BC₁ identificati con la sigla "NC" derivanti da incroci 4x × 2x tra varietà/cloni *S. tuberosum* e ibridi *S. tuberosum*-*S. phureja*.
- 31 ibridi BC₁ (codice MCPH) derivanti da incroci 3x × 4x tra un ibrido triploide *S. commersonii*-*S. tuberosum* e Blondy, una varietà coltivata di patata usata come impollinatore.



Fig. 4 – Fenotipo di ibrido MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* (A) e ibrido NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* (B)

Le sigle dei cloni NC sono seguite da due numeri-codici identificanti la combinazione dei parentali (il primo) e il numero di clone (il secondo). Nella tabella 2 sono riportati i codici assegnati per ogni combinazione d'incrocio ed il numero di cloni per ogni famiglia oggetto di studio.

Tab. 2 - Codici assegnati alle famiglie 4x × 2x (*Solanum phureja*-*Solanum tuberosum*), 3x × 4x (*Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii*) e numero di cloni valutati per ciascuna famiglia.

Parentali		N° Codice	N° cloni
Femminili	Maschili		
<i>S. tbr-S. phu</i>			
Carmine ×	I	NC 5	13
LC00116 ×	I	NC 10	17
MC330 ×	I	NC 12	12
Serrana ×	I	NC 15	17
S86 - 24 ×	I	NC 18	10
Atzimba ×	UP88-P5	NC 21	18
Carmine ×	UP88-P5	NC 23	12
LC00116 ×	UP88-P5	NC 25	21
MC330 ×	UP88-P5	NC 27	16
Serrana ×	UP88-P5	NC 30	17
<i>S. tbr-S. cmm</i>			
MCA 1 ×	Blondy	MCPH	31

4.2. Metodi

4.2.1. Valutazione della produzione

Le prove agronomiche finalizzate alla valutazione delle “performance” degli ibridi in esame sono state effettuate nel 2002 e 2003 presso l'Azienda Sperimentale Dimostrativa «Molarotta», dell'Agenzia di Sviluppo Agricolo della Calabria, sita a Camigliatello

Silano (CS), a 1300 m sul livello del mare. Le caratteristiche fisico - meccaniche e chimiche del terreno dei campi utilizzati negli anni di sperimentazione sono riportati in tabella 3.

Tab. 3 - Caratteristiche del terreno dei campi sperimentali utilizzati a Camigliatello Silano nel 2002 e 2003

Componente	Metodo d'analisi	Valori
Sabbia grossa		44%
Sabbia fina		37%
Limo		14%
Argilla		5%
Sostanza organica	K ₂ Cr ₂ O ₂	3,10%
P ₂ O ₅ assimilabile	Morgan	40,4 ppm
K ₂ O scambiabile	Morgan	43,3 ppm
Azoto totale	Kjeldal	0,15%
Sali solubili totali		0,15%
pH		5,6

L'impianto dei tuberi di ciascun genotipo è avvenuto nella seconda metà di maggio mentre la raccolta è stata effettuata dopo circa 4 mesi (fine settembre).

Gli ibridi NC (153 genotipi) e i parentali sono stati allevati secondo un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati con due repliche, ognuna delle quali contenente tre tuberi per clone (30 cm sulla fila e 70 cm fra le file), con un singolo tubero per buca; gli ibridi MCPH (31 genotipi) sono stati allevati secondo un disegno sperimentale randomizzato con cinque ripetizioni ed un tubero per ripetizione. Sono state adottate distanze di 30 cm nell'interfila e di 70 tra le file (figura 5).



Fig. 5 – Prova agronomica finalizzata alla valutazione delle performance produttive degli ibridi 4x × 2x *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*. Camigliatello Silano, 2003

Durante il ciclo vegetativo è stata valutata la precocità degli ibridi a 50, 70 e 90 gg dalla semina. Agli ibridi è stato assegnato un punteggio basato su una scala arbitraria variabile da 1 (precoce) a 3 (tardiva) in relazione al ciclo biologico della cultivar di riferimento “Spunta”.

Alla raccolta sono state valutate la produzione di tuberi per pianta e le seguenti caratteristiche:

- Lunghezza degli stoloni
- Forma dei tuberi
- Profondità degli occhi
- Colore degli occhi
- Colore della buccia del tubero
- Colore della polpa del tubero
- Peso specifico dei tuberi
- Contenuto in vitamina C

Peso specifico: il peso specifico dei tuberi è stato stimato indirettamente, pesando un campione di tuberi di 1 Kg circa, facendo

poi seguire la pesata dello stesso campione in acqua. Il peso specifico è ricavato dalla seguente formula:

$$P.S. = \frac{\text{Peso netto in aria}}{\text{Peso netto in aria} - \text{Peso netto in acqua}}$$

4.3. Valutazione del contenuto e del trasporto di vitamina C

La stima del contenuto in vitamina C è stata effettuata sui cloni NC, 4 genotipi tetraploidi (LC00116, MC330, Carmine, Atzimba), 2 ibridi *S. phureja* - *S. tuberosum* e 15 ibridi MCPH. È stato adottato un metodo colorimetrico, che consiste nell'uso di cartine specifiche che, a contatto con la pasta umida dei tuberi, si colorano. Per la valutazione si effettua poi un confronto su scala colorimetrica. Il test è stato effettuato dopo che i tuberi erano stati frigo-conservati a 7°C per un mese. Le strisce usate sono le “Ascorbic Acid Test” della MERCK. La tecnica ha previsto il taglio del tubero a metà e la raschiatura della parte interna, così da poter permettere la fuoriuscita di succhi cellulari. Su quest'ultimi sono state poste le striscette colorimetriche che nell'arco di 2 -3 secondi hanno assunto un colore in funzione della quantità di vitamina C presente nei succhi cellulari.

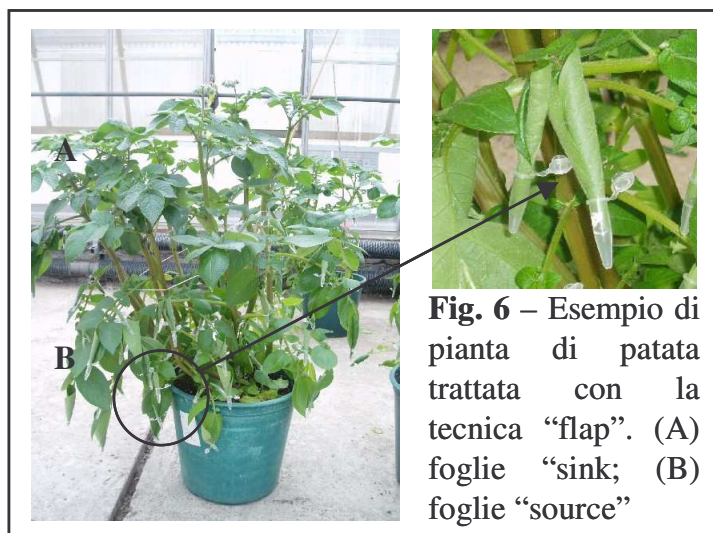
Presso i laboratori del Dr. Roberto Viola (Dipartimento “Quality, Health and Nutrition Program” dello “Scottish Crop Research Institute”, Scozia) è stato effettuato uno studio finalizzato a chiarire aspetti legati al trasporto e all'accumulo di vitamina C. A questo scopo è stata utilizzata come modello la varietà di patata

“Désirée”. Gli esperimenti sono stati effettuati dopo 40-60 giorni dalla semina ossia su piante in fase di tuberizzazione. Durante il test gli stoloni sono stati definiti come non-tuberizzanti quando hanno presentato un diametro uniforme lungo i 15 mm terminali; viceversa sono stati definiti tuberizzanti quando presentavano un rigonfiamento del diametro di 2-5 mm. Gonfiori con diametro fra i 5 e i 10 mm sono stati definiti come tuberi in sviluppo. Sono definiti “source” tutti gli organi che nella pianta svolgono un ruolo di produzione di determinati metaboliti, mentre gli organi di accumulo vengono etichettati come “sink”. I livelli di Vitamina C nelle foglie sono stati manipolati adottando la tecnica “flap” (Franceschi e Tarlyn 2002). Al termine del periodo di incubazione, le foglie sono state macinate in azoto liquido, estratte in 5% acido metafosforico (MPA) con 5 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) (9:1 p/v) e l’Vitamina C è stato misurato mediante HPLC in accordo con Hancock *et al.* (2000).

Le foglie terminali dei primi 4 nodi di tutti gli steli, (fra 8 e 10 per la pianta) sono state fornite simultaneamente di 500 µl 20 mM acido 2-Morpholinoethanesulfonic (MES), pH 5,5, 2 mM CaCl₂ eventualmente aggiunto di 25 mM L-galactono-1,4- lactone (L-GalL) per 24 ore (figura 6). Queste foglie sono state definite “source”. D-Glucosio (D-Glc) è stato invece fornito alle foglie delle piante di Désirée utilizzate come controllo. Per ogni trattamento sono state usate quattro piante. Alla conclusione dell'incubazione, da ciascuna pianta sono stati separati i fiori, le foglie “source”, le foglie “sink”, i piccioli, gli steli, gli stoloni non tuberizzanti (ultimi 15 mm), gli

stoloni tuberizzanti (parte rigonfiata) e tuberi in sviluppo (diametro inferiore a 5 mm). I tessuti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido per poi essere liofilizzati. Il liofilizzato è stato macinato fino ad ottenere polvere sottile e poi estratto in triplice copia (1 grammo per replica) in 5% MPA, 5 mM TCEP (19:1 p/v). Il quantitativo di Vitamina C è stato determinato poi mediante HPLC. Tutti i tuberi prodotti avevano un diametro inferiore a 5 mm.

Per la quantificazione della vitamina C, i tessuti vegetali sono stati tritati in azoto liquido e con l'aggiunta di 5% MPA, precedentemente raffreddato in ghiaccio e contenente 5 mM TCEP (9:1 p/v). I campioni sono stati quindi tenuti su ghiaccio per 60 minuti. Tutti i dati sono stati quindi riportati come acido L-ascorbico totale (vitamina C), ossia AsA + acido deidroascorbico. I campioni sono stati centrifugati a 16000 g per 5 minuti a 1°C per poi essere analizzati mediante HPLC secondo il metodo di Hancock *et al.* (2000).



4.4. Valutazione della resistenza all'appassimento batterico (*Ralstonia solanacearum*)

In collaborazione con il prof. A. Zoina, del Dipartimento di Arboricoltura e Patologia Vegetale della Facoltà Agraria di Portici, sono stati effettuati test di resistenza all'appassimento batterico determinato da *R. solanacearum*. Sono stati testati 30 ibridi MCPH. Sono stati inclusi nella prova anche il parentale selvatico *S. commersonii*, le varietà “Adora” e “Blondy” di *S. tuberosum*, i parentali triploidi ed una progenie 5x × 4x.

Le piante di ciascun genotipo sono state propagate *in vitro* su substrato contenente sali di Murashige e Skoog, 30 g l⁻¹ di saccarosio, 8 g l⁻¹ di agar, pH 5,8; all'età di 4 settimane 15 piante/genotipo sono state trapiantate in vasetti. Il materiale vegetale è stato quindi allevato per 7-10 giorni in camera di crescita con 16 ore di luce e temperatura di 24°C. Dopo questa fase di acclimatemento le piante sono state trasportate in allevate serra per 2-3 settimane, ossia fino al raggiungimento di 8-11 foglie (13-15 cm di altezza). A questo punto le piantine sono state inoculate. L'inoculo è stato effettuato ferendo le radici con una spatola e innaffiando la superficie del terreno con 2 ml di sospensione batterica alla concentrazione di $2,5 \times 10^7$ cfu (figura 7). Per ogni genotipo sono state utilizzate 3 piante come controllo negativo (inoculate con acqua sterile) e 8 come test. Le piantine inoculate sono state poste in una camera di crescita alle seguenti condizioni termo-foto-igrometriche: luce (12 h di luce e 12 h di buio);

temperatura (21°C durante le ore di buio, 27°C durante le ore di luce,) e umidità (85%) (figura 7).

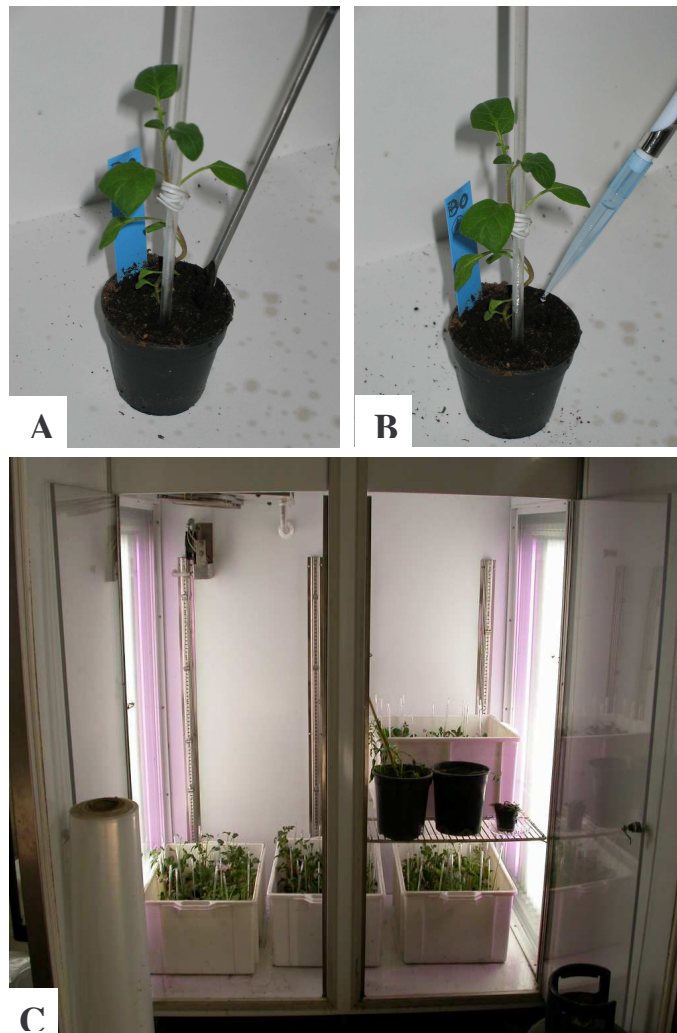


Fig. 7 – Test di sensibilità a *Ralstonia solanacearum*: ferite alle radici con una spatola (A), inoculo del terreno con la sospensione batterica (B) e camera di crescita con il test in corso (C).

A distanza di 6-9-12-15-17 e 20 gg, sono stati effettuati rilievi per controllare l'andamento della patologia batterica. Ad ogni rilievo,

per ogni pianta, è stato determinato un indice di malattia variabile da 0 a 5, (figura 4). In particolare 0 = pianta sana, 1 < 25 % foglie infette, 2



Fig. 8 - Scala da 0 a 5 utilizzata per la valutazione della resistenza a *R. solanacearum* degli ibridi MCPH *Solanum tuberosum* – *S. commersonii*.

dal 26 % al 50 % di foglie infette, 3 dal 51 % al 75 % foglie infette, 4 oltre 75 % di foglie infette e 5 pianta morta. Dall'indice di malattia è stato calcolato l'indice di Mc Kinney secondo la formula seguente:

$$\text{Mc Kinney} = \frac{\sum_1^5 \text{Indice di malattia} \times \text{N}^\circ \text{ piante con tale indice di malattia}}{\text{N}^\circ \text{ piante totali}}$$

Un indice di Mc Kinney inferiore ad 1 è stato considerato indice di resistenza; fra 1,1 e 2,4 di media resistenza; mentre un indice superiore a 2,5 è stato valutato come indicatore di suscettibilità.

Un ulteriore indice è stato determinato per questo carattere, il grado di dominanza. Esso è un valore numerico che serve per stimare

il modello di eredità della resistenza a *R. solanacearum*. È stato calcolato con la seguente formula (Falconer 1989):

$$\text{Grado di dominanza (d/a)} = \frac{\text{Media progenie} - \text{media parentali}}{\text{Media parentali} - \text{valore parentale resistente}}$$

Più grande la deviazione di d/a da zero, maggiore è la dominanza fenotipica, con i valori negativi e positivi che indicano rispettivamente dominanza del genitore resistente (*S. commersonii*) e suscettibile (*S. tuberosum*).

4.5. Valutazione della resistenza al marciume molle dei tuberi (*Erwinia carotovora ssp. carotovora*)

In collaborazione con il prof. A. Zoina, del Dipartimento di Arboricoltura e Patologia Vegetale della Facoltà Agraria di Portici, sono stati effettuati test di resistenza al marciume molle causato da *E. carotovora ssp. carotovora*. Sono stati testati 116 cloni appartenenti al gruppo NC e 21 cloni MCPH. Per alcuni cloni è stato deciso di ripetere il test di resistenza due volte per avere maggiori informazioni sull'effettiva resistenza al patogeno e identificare eventuali effetti ambientali.

Il protocollo seguito per la realizzazione del test è di seguito riportato. I tuberi sono stati sterilizzati in soluzione con 20% di ipoclorito per 20 minuti per poi essere lavati con una soluzione alcolica al 95%. Lavorando in condizioni di sterilità sotto cappa a

flusso laminare e mediante l'ausilio di punte di trapano adeguatamente sterilizzate, è stato praticato un numero variabile di fori a seconda delle dimensioni dei tuberi (dai 3 ai 7 fori, 2 cm lunghezza e 2 mm diametro). In detti fori, mediante l'uso di micropipette, sono stati inseriti 20 µl di sospensione batterica di *E. carotovora* ssp. *carotovora* (ceppo 007), fornito dal "International Potato Centre" di Lima (Perù) (figura 9). Il batterio è stato incubato su substrato NAG (agar nutriente glucosato) per poi essere lasciato crescere a 25° C per 48 ore. La patina microbica è stata successivamente raccolta e posta in acqua sterile. La sospensione batterica alla concentrazione di 1×10^{-7} cfu/ml è stata preparata mediante l'uso dello spettrofotometro calibrato a 530 nm. I tuberi inoculati sono stati disposti in contenitore con acqua sterile su uno sfondo di carta assorbente sterile. Un foro per tubero è stato inoculato con acqua sterile come controllo negativo.

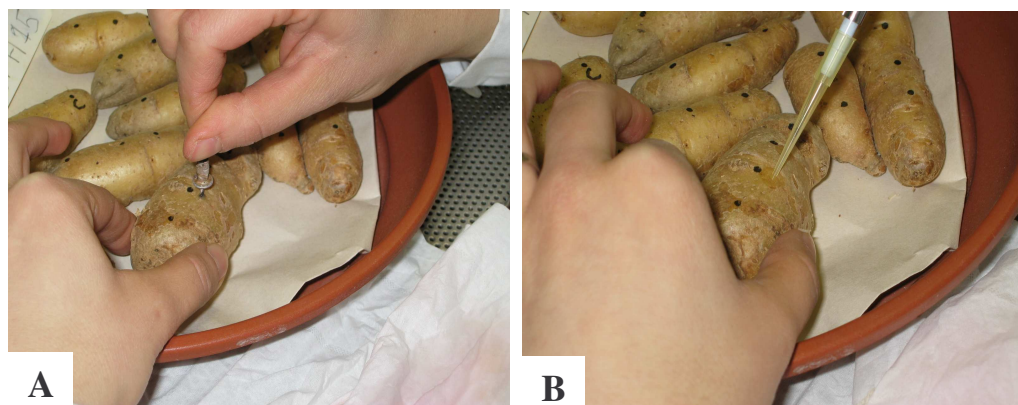


Fig. 9 – Test di sensibilità ad *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: perforazione (A) ed inoculo (B) dei tuberi con la sospensione batterica.

Il contenitore è stato posto a 22°C per 72 ore. Trascorso questo periodo, i tuberi sono stati tagliati longitudinalmente ai fori per

misurare le lesioni causate dal batterio. I cloni con un valore medio delle lesioni inferiore a 4 mm sono stati considerati resistenti, quelli con diametro compreso fra 4,1 mm e 6 mm sono stati considerati mediamente resistenti, mentre i cloni con lesioni medie superiori a 6,1 mm sono stati considerati suscettibili.

4.6 Valutazione della resistenza alla peronospora (*Phytophthora infestans*)

In collaborazione con il prof. G. Cristinzio del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale della Facoltà Agraria di Portici, sono state effettuate delle prove preliminari su 19 cloni MCPH per resistenza a *Phytophthora infestans*. Per il saggio di resistenza è stata utilizzata una sospensione di zoosporangi di *P. infestans* con una concentrazione pari a circa 40000 sporangi ml⁻¹. La sospensione è stata preparata prelevando il micelio superficiale dalle piastre Petri e sospendendolo in acqua distillata. Dopo aver filtrato il tutto, è stata valutata la concentrazione della sospensione tramite vetrino contaspore. Per ricercare le fonti di resistenza non razza-specifica, sono stati utilizzati 7 ceppi differenti di *P. infestans* isolati da piantine malate di patata in diverse regioni italiane. L'inoculo è stato effettuato sistemando 3 foglioline per ogni genotipo in piastre Petri contenenti un dischetto di carta sterile e una griglia di plastica su cui le foglie sono state poggiate con la pagina superiore rivolta verso il basso. Esse sono state ferite in due punti differenti con un ago e inoculate ad ogni ferita con 50 µl della sospensione fungina (figura 10); altre tre

foglioline per genotipo, in differente piastra Petri, sono state inoculate con acqua distillata e utilizzate come controllo. Dopo aver effettuato l'inoculo il dischetto di carta è stato bagnato con acqua distillata per mantenere condizioni elevate di umidità relativa; le piastre sono state mantenute a 27-28°C e in condizioni di luce tenue, per permettere il miglior funzionamento della tecnica. Dopo cinque giorni di incubazione nelle condizioni indicate, è stata effettuata l'osservazione al microscopio ottico dei sintomi tipici della malattia, con particolare attenzione alla sporulazione del fungo sulle foglioline malate.

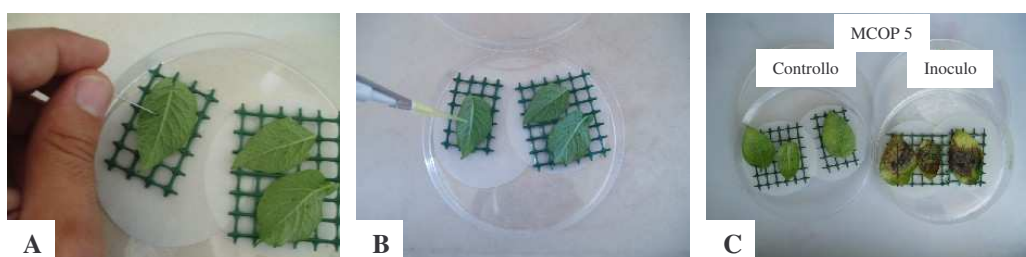


Fig. 10 – Test di resistenza a *Phytophthora infestans*: ferita con ago (A), inoculo (B) , esito dopo 5 gg per il genotipo MCOP 5 (C)

I genotipi sono stati quindi valutati sulla base dell'entità del diametro delle lesioni determinate dal patogeno e classificati in resistenti (R), mediamente resistenti (MR) e suscettibili (S). Insieme ai genotipi MCPH, è stato inoculata la varietà suscettibile Spunta come controllo positivo.

4.7 Analisi con marcatori AFLP degli ibridi *S. tuberosum*-*S. commersonii*

Presso i laboratori del Dr. Roberto Viola (Dipartimento “Quality, Healt and Nutrition Program” dello “Scottish Crop Research

Institute”, Scozia) sono state effettuate analisi molecolari volte ad identificare la percentuale di genoma selvatico negli ibridi MCPH.

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il Kit commerciale messo a disposizione dalla QIAGEN: DNeasy® Plant Mini Kit. I campioni di tessuto vegetale (100mg) sono stati prelevati da piante di quattro settimane e macerati meccanicamente in azoto liquido, mediante l'utilizzo di mortaio e pestello o direttamente in un eppendorf da 0,5 ml con aggiunta di una soluzione tampone attraverso l'utilizzo di un particolare trapano con punta in plastica. Il tessuto vegetale macerato è stato poi incubato a 65°C per 10 minuti in seguito all'aggiunta di un tampone di lisi.

Successivamente, polisaccaridi e proteine sono stati eliminati mediante precipitazione salina. L'uso di una colonnina contenente una membrana di resina ha permesso l'allontanamento dei detriti cellulari e dei prodotti di precipitazione attraverso un singolo passaggio di centrifugazione a 14000 rpm per due minuti. Il legame del DNA alla membrana è stato indotto tramite aggiunta di un opportuno tampone. Il DNA è stato, infine, eluito con acqua distillata (100 µl) mediante centrifugazione ad 8000 rpm per 1 minuto.

4.8Analisi AFLP

Il DNA estratto è stato sottoposto ad analisi AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) secondo il protocollo di Vos *et al.* (1995)

4.8.1 Digestione e ligazione del DNA

Il DNA genomico è stato digerito in una miscela di reazione contenete DNA (125 ng), buffer 5x (2.5 µl) ed EcoRI/MseI (1 µl). È stata aggiunta acqua distillata fino ad un volume finale di 12.5 µl. Il tampone di reazione 5x è costituito da Tris-HCl pH 7.5 (50 mM); acetato di magnesio 50 mM; acetato di potassio (250 mM). La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per due ore, quindi a 70°C per 15 minuti in modo da inattivare le endonucleasi di restrizione. Il DNA digerito è stato sottoposto alla reazione di ligazione mediante aggiunta di:

- 1 U di T4 DNA ligasi in Trio HCl 10mM a pH 7.5, DDT 1.0 mM, KCl 50 mM, glicerolo 50% (v/v);
- adattatori a doppia elica EcoRI (2.5 pmoli) ed MseI (2.5 pmoli), contenuti in soluzione di ATP 0.4 mM, Tris HCl 10mM a pH 7.5, acetato di magnesio 10 mM e acetato di potassio 50 mM.

Per ottenere la ligazione la reazione è stata incubata per due ore ad una temperatura di 20°C ed il prodotto è stato diluito 1:10 con TE 1x (Tris HCl pH 8.0, EDTA 0.1 mM). Le sequenze degli adattatori sono:

Adattatore EcoRI:

5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'

3' CATCTGACGCATGGTTAA 5'

Adattatore MseI: 5'GACGATGAGTCCTGA 3'
 3' TACTCAGGACTCAT 5'

4.8.2 Amplificazione pre-selettiva

Il DNA ligato e diluito (1:10), è stato pre-amplificato in una reazione con volume finale di 28 μ l contenente: DNA 1:10 (2.5 μ l), Buffer PCR 10x (2.5 μ l), taq-polimerasi 5 U/ μ l (0.5 μ l), Primer mix (20 μ l). Il Buffer PCR 10x contiene HCl pH 8.4 (200 mM), MgCl₂ (15 mM), KCl (500 mM), dNTP (0.8 mM).

I primer di pre-amplificazione presentano una singola base selettiva all'estremità 3' e riconoscono le estremità generate nella precedente reazione di ligazione:

EcoRI primer pre-selettivo: 5' GACTGCGTACCAATTCN 3'

MseI primer pre-selettivo: 5' GATGAGTCCTGAGTAAN 3'

I campioni sono stati amplificati seguendo il ciclo di temperature riportato:

94°C per 30 secondi

56°C per 60 secondi

72°C per 60 secondi

└─ 20 cicli

I prodotti della reazione sono stati diluiti 1:30 con TE 1X.

4.8.3 Amplificazione selettiva

La miscela di componenti di reazione per l'amplificazione selettiva di ciascun campione è stata preparata utilizzando:

- 2 µl di primer EcoRI marcato con fluorocromo (Hex, Fam o Ned)
- 4.5 µl di primer MseI
- 0.1 µl di Taq polimerasi 5U/ µl
- 2 µl di Buffer PCR 10X
- 5 µl di DNA pre-amplificato diluito 1:30

È stato aggiunta acqua fino a raggiungere un volume di 20 µl. I primer utilizzati presentano un estensione al 3' costituita da tre nucleotidi:

Primer EcoRI selettivo: 5' GACTGCGTACCAATTCNNN 3'

Primer MseI selettivo: 5' GATGAGTCGTGAGTAANNN 3'

La reazione PCR è dapprima di tipo “touch-down” con decremento di 0,6°C della temperatura di “annealing” ad ogni ciclo di amplificazione:

94°C per 60 secondi

65°C per 60 secondi

72°C per 90 secondi

└─ 13 cicli

Alla reazione di “touch-down” segue il ciclo di amplificazione:

94°C per 60 secondi

56°C per 60 secondi

72°C per 90 secondi

└─ 23 cicli

Le 7 combinazioni di primer testate negli ibridi MCPH sono state:

Eco ACT/Mse CAT; Eco ACT/ Mse CAA; Eco ACT/ Mse CAG; Eco ACT/ Mse CAC; Eco AGG/Mse/CAA; Eco AGG/Mse CAG; Eco ACC/Mse CAT

4.8.4 Separazione dei frammenti di DNA amplificati su gel di acrilammide

Il prodotto della reazione di amplificazione di ciascun campione (20 µl), è stato miscelato con un ugual volume di tracciante blue dextran e denaturato a 94°C per 10 minuti. Successivamente, 4 µl della miscela sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel denaturante al 6% di acrilammide/urea (20:1) (acrilammide: bis, urea 7.5 mM, tampone TBE 1X), in un tampone di corsa TBE 1X; ad un voltaggio costante di 1600 volt. Il marcatore utilizzato per queste analisi molecolari è stato il Rox, prodotto e fornito dalla ABI PRISM®; tale marcatore è tale da definire le dimensioni dei frammenti di restrizione compresi tra 35 e 500 nucleotidi.

La corsa elettroforetica è stata effettuata per tre ore, in seguito il gel è stato sottoposto ad una scansione al Typhoon 9200 per ottenere i profili di restrizione dei campioni analizzati. I dati ottenuti dal pattern elettroforetico sono stati immessi in una matrice binaria che riporta nei diversi campioni, la presenza (1) e l'assenza (0) di bande. Mediante l'analisi della matrice così ottenuta, è stato determinato la percentuale di genoma selvatico presente negli ibridi MCPH.

4.9 *Analisi statistiche e calcolo dell'indice di valutazione*

I dati presentati nel presente lavoro sono stati elaborati mediante l'utilizzo di software statistico "SPSS" versione 11.5. I dati produttivi sono stati statisticamente analizzati mediante l'analisi della varianza. Le differenze individuate sono state poi confrontate mediante il test di Duncan.

Con l'ausilio del software prima citato, è stata effettuata anche la "Principal Component Analysis" (PCA). La PCA ha come scopo l'identificazione di una struttura sottostante ad un insieme di variabili osservate; e quindi l'identificazione di fattori non direttamente rilevabili sulla base di un insieme di variabili osservabili. Il suo uso implica lo studio delle correlazioni tra variabili allo scopo di trovarne un nuovo insieme, di dimensioni minori rispetto a quello delle variabili originarie, che esprima ciò che è in comune fra le variabili originarie stesse. Si cerca quindi di "condensare" e "ridurre" i dati, cercando di perdere la minore quantità possibile di informazione.

Al fine di identificare i migliori ibridi MCPH, ossia gli ibridi con una minore percentuale di genoma selvatico e la presenza di caratteri positivi, è stato calcolato un indice di valutazione assegnando ad ogni carattere d'interesse un punteggio in funzione di una scala arbitraria di seguito riportata. **1) resistenza ad *Erwinia carotovora*:** 1 = diametro lesione $\geq 8,1$ mm, 2 = diametro lesione compreso fra 6,1 e 8 mm, 3 = diametro lesione compreso fra 6 e 4,1 mm, 4 = diametro lesione ≤ 4 mm; **2) resistenza a *Ralstonia solanacearum*:** 1 = indice malattia $\geq 3,6$, 2 = indice malattia compreso fra 2,5 e 3,5, 3 = indice malattia compreso fra 1,1 e 2,4, 4 = indice malattia ≤ 1 ; **3) contenuto vitamina C:** 1 = percentuale rispetto a "Spunta" ≤ 20 , 2 = percentuale

rispetto a “Spunta” compresa fra 21 e 40, 3 = percentuale rispetto a “Spunta” compresa fra 41 e 60, 4 = percentuale rispetto a “Spunta” ≥ 61 ; **4) produzione**: 1 = produzione ≤ 150 g pt⁻¹, 2 = produzione compresa fra 151 e 300 g pt⁻¹, 3 = produzione compresa fra 301 e 450 g pt⁻¹, 4 = produzione ≥ 451 g pt⁻¹; **5) peso specifico (Ps)**: 1 = Ps $\leq 1,070$, 2 = Ps compreso fra 1,071 e 1,080, 3 = Ps compreso fra 1,081 e 1,090, 4 = Ps $\geq 1,091$; **6) profondità occhi**: 1 = occhi molto profondi, 2 = occhi profondi, 3 = occhi con media profondità, 4 = occhi superficiali; **7) lunghezza stoloni**: 1 = stoloni lunghi, 2 = stoloni medi, 4 = stoloni corti. I parametri presi in considerazione hanno un differente peso ai fini del miglioramento genetico. Gli ibridi MCPH sono una generazione BC₁ e necessitano di ulteriori reincroci per la costituzione di un genotipo da proporre come nuova varietà. È stato quindi deciso di ponderare il punteggio di ogni parametro, attribuendo una maggiore importanza alle caratteristiche di resistenza rispetto ad altri caratteri. Il punteggio relativo ai caratteri di resistenza è stato moltiplicato per un fattore di correzione di 1,5, mentre le altre caratteristiche sono state moltiplicate per un fattore di correzione uguale a 0,5.

5. Risultati

5.1 Produzione di tuberi

In allegato 1 sono riportati i dati produttivi medi e la deviazione standard dei singoli genotipi NC per i due anni di valutazione. La media produttiva di campo è stata di 0,37 kg pt⁻¹ nel 2002 e 0,49 kg pt⁻¹ nel 2003. Tali valori medi sono stati superati rispettivamente da 65 (41%) e 68 (43%) genotipi. Per quanto riguarda il numero dei tuberi medio per pianta invece, la media nel 2002 è stata di 5,3 mentre nel 2003 è stata di 7,6. Tali medie sono state superate rispettivamente da 69 (43%) e 70 (44%) cloni. Fra i cloni particolarmente produttivi nel 2002 vanno segnalati NC 18-8; NC 5-15 e NC 10-11 per le loro produzioni (1,0; 0,97, 0,96 Kg pt⁻¹ rispettivamente). L'anno successivo invece sono state registrate produzioni massime di circa 1,5 volte rispetto alle massime produzioni prima citate. I cloni NC 21-15, NC 30-8 e NC 27-6 hanno, infatti, prodotto rispettivamente 1,67; 1,35 e 1,33 Kg pt⁻¹.

Per quanto riguarda il numero dei tuberi, nel 2002 il numero medio massimo di tuberi prodotti da un genotipo è stato di 13 tuberi (NC 10-10) seguito da 12,7 e 12,5 (NC 10-11 e NC 21-3 rispettivamente). Produzioni molto più alte in termini di numero medio di tuberi sono state registrate nel 2003. NC 30-3, NC 27-6 e NC 10-5 hanno rispettivamente prodotto 18,8, 20,8 e 22,8 tuberi per pianta.

L'analisi della varianza per produzione e numero di tuberi per entrambi gli anni è riportata nella tabella 4.

È stato evidenziato un effetto significativo di quasi tutte le fonti di variazione per produzione di tuberi e numero di tuberi durante entrambi gli anni. Soltanto i genitori 4x per il numero di tuberi nel 2002 ed i genitori 2x per produzione e numero di tuberi durante entrambi gli anni non sono risultati fonti significative di variazione.

Tab. 4 - Analisi della varianza per produzione (PT) e numero di tuberi (NT) dei cloni 4x x 2x *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*, delle famiglie 4x x 2x *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*. Le valutazioni sono state effettuate a Camigliatello Silano nel 2002 e 2003

Fonte di variazione	g.l.	Varianza							
		2002				2003			
		PT		NT		PT		NT	
Blocchi	1	301766,09	**	13,04	n.s.	147598,12	n.s.	74,58	**
Cloni NC	150	100176,72	**	13,64	**	190052,92	**	28,80	**
Famiglie NC	9	28345,00	**	2,82	**	39222,78	**	4,51	**
Parentali 4x	5	174353,33	**	18,13	n.s.	73740,00	**	8,21	*
Parentali 2x	1	3025,00	n.s.	1,01	n.s.	2500,00	n.s.	1,37	n.s.
Cloni vs parentali 4x	1	127598,143	*	8,646	*	391453,875	*	118,732	**
Cloni vs parentali 2x	1	208407,277	**	0,005	n.s.	814284,223	**	95,007	**
Errore	158	27701,49		6,44		59980,65		7,52	

n.s. = non significativo

* = $P \leq 0,05$

** = $P \leq 0,01$

g.l. = gradi di libertà

L'ANOVA combinata per i due anni di prova (tabella 5) ha indicato effetti significativi dei cloni 4x x 2x, delle famiglie 4x x 2x e dei parentali 4x così come le loro interazioni con l'anno sia per la produzione che per il numero dei tuberi prodotti. L'effetto dell'anno è stato significativo soltanto per il numero dei tuberi e non per la produzione, mentre l'effetto del genitore 2x non è stato mai significativo.

Nella tabella 6 è riportata la media produttiva, la percentuale dei cloni 4x x 2x che hanno superato la produzione dei parentali

tetraploidi e l'eterosi per la produzione delle famiglie 4x × 2x nel 2002 and 2003.

Tab. 5 - Analisi della varianza combinata per produzione e numero di tuberi dei cloni 4x x 2x *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*, delle famiglie 4x x 2x *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* e dei parentali.

Fonte di variazione	g.l.	Produzione tuberi			Numero tuberi		
		Varianza	F		Varianza	F	
Anno	1	2819338,1	12,5	n.s.	917,3	20,9	*
Cloni NC	150	174625,2	3,8	**	26,8	3,7	**
Famiglie NC	9	48286,5	22,2	**	5,6	16,2	**
Parentali 4x	5	128946,7	29,2	**	11,3	4,1	*
Parentali 2x	1	5512,5	2,0	n.s.	2,4	0,9	n.s.
Cloni vs parentali 4x	1	4483382,0	102,6	**	978,9	140,2	**
Cloni vs parentali 2x	1	299924,1	6,8	**	6,7	2,2	*
Cloni x anno	150	115604,4	2,5	**	15,7	2,2	**
Famiglie x anno	9	18338,4	8,4	**	1,6	4,6	**
Parentali 4x x anno	5	119146,7	27,0	**	15,1	5,4	*
Parentali 2x x anno	1	12,5	0,0	n.s.	0,0	0,0	n.s.
Errore	316	43841,1			7,0		

n.s. = non significativo

* = $P \leq 0.05$

** = $P \leq 0.01$

g.l. = gradi di libertà

Nel 2002 la produzione più elevata è stata ottenuta da NC 5 (0,58 kg pt⁻¹), nel 2003 da NC 30 (0,73 kg pt⁻¹). Confrontando la produzione media delle famiglie con la produzione media dei parentali, è da sottolineare che nel 2002 solo la famiglia NC 5 ha fatto registrare una produzione statisticamente superiore alla produzione media dei parentali 4x. Di contro, nel 2003 cinque delle dieci famiglie (NC 5, NC 10, NC 15, NC 21, NC 27) hanno significamente prodotto più dei parentali tetraploidi. La medesima tabella riporta inoltre la percentuale dei cloni di ogni famiglia che ha prodotto più dei parentali 4x. Questa percentuale è variata dal 0% al 70% nel 2002 (NC 25 e NC

21, rispettivamente), e dal 10% al 100% nel 2003 (NC 18 e NC 15, rispettivamente). La bassa produzione delle famiglie 4x × 2x nel 2002 ha comportato bassi valori di eterosi. Solo due famiglie hanno dato buoni valori di eterosi (NC 21 e NC 30, 70% e 48% rispettivamente). Le buone performance delle famiglie 4x × 2x nel 2003 hanno determinato una più alta eterosi; sette famiglie infatti hanno mostrato un valore di eterosi superiore al 100%.

Tab. 6 - Produzione media dei tuberi per piante (PT), percentuale dei cloni più produttivi dei rispettivi parentali 4x (C.E.P.) e valore dell'eterosi delle famiglie NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* valutate a Camigliatello Silano nel 2002 e nel 2003. Le produzioni medie sono riportate anche per i parentali 4x e parentali 2x.

Famiglie	PT (kg pt ⁻¹)									
	2002					2003				
	media ^b	range		C.E.P. (%)	eterosi ^a (%)	media ^b	range		C.E.P. (%)	eterosi ^a (%)
		min	max				min	max		
NC 5	0,58 A	(0,25	- 0,97)	14	19	0,58 ABC	(0,05	- 1,30)	86	256
NC 6	0,46 B	(0,13	- 0,96)	5	-3	0,58 ABC	(0,16	- 1,10)	41	109
NC 12	0,23 EF	(0,05	- 0,58)	40	16	0,29 D	(0,03	- 0,53)	50	74
NC 15	0,45 BC	(0,13	- 0,90)	39	25	0,63 AB	(0,07	- 1,12)	88	104
NC 18	0,34 D	(0,07	- 1,00)	8	12	0,41 CD	(0,01	- 0,71)	10	6
NC 21	0,30 DE	(0,06	- 0,75)	70	124	0,56 ABC	(0,08	- 1,67)	78	296
NC 23	0,36 CD	(0,18	- 0,83)	8	-22	0,33 D	(0,13	- 0,67)	75	143
NC 25	0,29 DE	(0,03	- 0,72)	0	-34	0,40 CD	(0,07	- 0,76)	29	59
NC 27	0,18 F	(0,03	- 0,37)	40	11	0,53 BC	(0,04	- 1,33)	81	245
NC 30	0,33 DE	(0,05	- 0,73)	48	79	0,73 A	(0,38	- 1,35)	100	157
Parentali 4x	0,47 B	(0,18	- 0,82)			0,33 D	(0,13	- 0,65)		
Parentali 2x	0,14 F	(0,11	- 0,17)			0,06 E	(0,03	- 0,08)		

^a I valori dell'eterosi sono stati determinati con la seguente formula: eterosi = (media famiglia-media dei parentali)/ media parentali.

^b medie seguite dalla stessa lettere, in accordo con il test di Duncan, non differiscono statisticamente per P ≤ 0.01.

Nella figura 11 sono stati messi a confronto la media biennale della produzione per pianta del parentale maschile diploide, del parentale femminile *S. tuberosum*, della famiglia e del miglior clone della famiglia. In 7 famiglie il miglior clone ha sempre prodotto più

del parentale femminile tetraploide. Fanno eccezione le famiglie NC 23 e NC 25 i cui rispettivi migliori cloni hanno ottenuto le stesse produzioni del parentale 4x. In 5 casi (NC 5, NC 12, NC 15, NC 21, NC 27) anche la produzione media per famiglia è stata superiore al parentale femminile.

La tabella 7 riporta la media del numero dei tuberi prodotti delle famiglie 4x × 2x nel 2002 e 2003. Paragonando la media delle famiglie alla media dei parentali 4x, è interessante notare che nel 2002 tutte le famiglie, eccetto NC 10 e NC 25, hanno prodotto un numero di tuberi significativamente inferiore al numero di tuberi mediamente prodotti dai parentali 4x. Un trend opposto è stato invece osservato nel 2003, quando tutte le famiglie, eccezion fatta per tre di esse (NC 12, NC 18, NC 23) hanno prodotto un numero di tuberi più alto rispetto a quello mediamente prodotto dai parentali 4x.

È inoltre da segnalare che su dieci famiglie 4x × 2x analizzate, 3 nel 2002 (NC 12; NC 21; NC 30) e 8 nel 2003 (NC 5; NC 10; NC 12; NC 15; NC 21; NC 23; NC 27; NC 30) hanno prodotto più tuberi dei rispettivi parentali tetraploidi (dati non mostrati). In entrambi gli anni, in ogni famiglia sono stati trovati cloni che hanno prodotto un numero di tuberi superiore a quello prodotto dal parentale 4x.

La tabella 8 riporta la produzione, il numero di tuberi e le caratteristiche morfologiche dei 10 migliori cloni che hanno tutti prodotto più dei rispettivi parentali 4x. Il clone 15 della famiglia NC 21 ha dato il miglior risultato con una produzione per pianta di 1,205 kg pt⁻¹ e 12 tuberi.

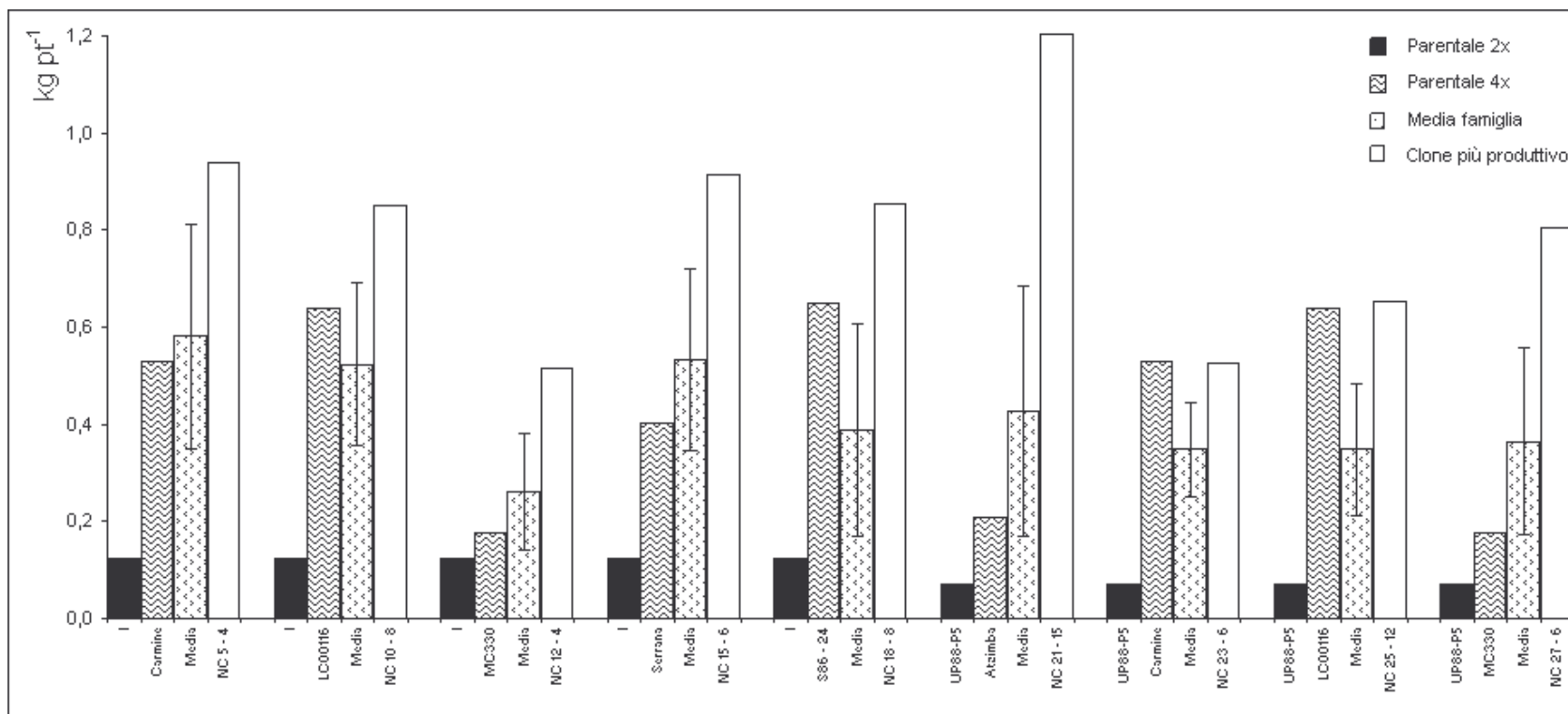


Fig. 11 - Produzione medie di ciascuna famiglia NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* confrontata con quella dei parentali e del clone più produttivo

Tab. 7 - Numero medio di tuberi per pianta (NT) delle famiglie NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* valutate a Camigliatello Silano nel 2002 e nel 2003

Famiglie	NT					
	2002			2003		
	media ^z	range		media ^a	range	
		min	max		min	max
NC 5	5,5 D	(2.3 - 10.0)		8,6 AB	(2.2 - 18.0)	
NC 6	6,8 A	(1.8 - 13.0)		10,0 A	(4.5 - 22.8)	
NC 12	3,2 J	(0.8 - 9.2)		4,8 CD	(2.6 - 8.3)	
NC 15	5,0 F	(2.7 - 10.0)		7,8 AB	(2.7 - 13.2)	
NC 18	4,2 H	(1.3 - 10.0)		6,3 BC	(0.3 - 10.3)	
NC 21	5,5 D	(0.3 - 12.5)		7,7 AB	(3.0 - 18.7)	
NC 23	4,8 D	(2.7 - 9.0)		6,2 BC	(3.5 - 10.8)	
NC 25	6,5 B	(2.0 - 12.0)		7,9 AB	(2.7 - 12.3)	
NC 27	3,4 I	(0.8 - 5.8)		8,6 AB	(2.0 - 20.8)	
NC 30	4,6 G	(1.7 - 11.0)		8,7 AB	(5.2 - 18.8)	
Parentali 4x	6,1 C	(2.7 - 10.2)		4,6 CD	(2.7 - 7.9)	
Parentali 2x	5,2 E	(4.7 - 5.7)		2,9 D	(2.3 - 3.5)	

^a medie seguite dalla stessa lettere, in accordo con il test di Duncan, non differiscono statisticamente per $P \leq 0,01$

Tab. 8 - Produzione media dei tuberi (PT) e numero tuberi medio (NT), eterosi e caratteristiche morfologiche dei tuberi dei migliori 10 cloni NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*

Famiglia	Codice clone	PT (kg pt ⁻¹)	NT	Eterosi (%)	Caratteristiche morfologiche			
					Forma tubero	Occhi	Colore occhi buccia	
NC 21	15	1,21	12,2	623	Rotonda	Profondi	Rosso	Giallo
NC 30	3	0,98	13,3	220	Ovale	Superficiali	Rosso	Giallo
NC 30	8	0,98	8,3	217	Ovale	Profondi	Rosso	Giallo
NC 5	4	0,94	10,3	187	Rotonda	Profondi	Giallo	Rosso
NC 15	6	0,91	7,1	173	Rotonda	Superficiali	Rosso	Giallo
NC 5	8	0,91	6,8	178	Rotonda	Profondi	Giallo	Giallo
NC 18	8	0,86	10,0	107	Rotonda	Profondi	Rosso	Giallo
NC 10	8	0,85	9,2	123	Rotonda	Profondi	Rosso	Giallo
NC 10	11	0,82	13,7	114	Rotonda	Profondi	Rosso	Giallo
NC 15	12	0,82	8,6	144	Rotonda	Superficiali	Rosso	Giallo

In termini di eterosi, il clone 15 della famiglia NC 21 ha fornito anche il più alto valore (623%), mentre il clone 8 della famiglia NC 18 il più basso (107%). Da sottolineare inoltre che fra questi 10 cloni, i primi tre derivano da incroci con il genitore diploide UP88-P5, e che quattro coinvolgono il parentale 4x “Serrana Inta”.

Le performance produttive degli ibridi MCPH sono riportate nella tabella 9. Nell’anno 2002 la media di campo per il carattere “produzione tuberi” è stata 0,325 kg pt⁻¹ mentre nel 2003 di 0,285 kg pt⁻¹, con un decremento medio del 12,5%. Nel 2003, invece, a fronte di una produzione di campo media inferiore, ben dieci genotipi hanno offerto una performance migliore rispetto all’anno precedente. Il valore massimo è stato di 0,563 kg pt⁻¹ (MCPH 22), valore praticamente identico all’anno precedente. Il valore minimo è stato di 0,09 kg pt⁻¹ (MCPH 33). Anche stavolta dieci ibridi hanno prodotto al di sopra della media di campo e in sette casi sono stati gli stessi che l’hanno superato l’anno precedente. Tuttavia è da segnalare che nel 2003 nessuno ibrido MCPH è risultato più produttivo della varietà Spunta che ha prodotto 0,67 kg pt⁻¹.

Nel primo anno 10 genotipi (42% degli MCPH) hanno avuto una produzione superiore alla media di campo e i più produttivi sono risultati, in ordine, MCPH 11 con 0,9 kg pt⁻¹, MCPH 7 con 0,58 kg pt⁻¹ e poi MCPH 20, MCPH 22 ed MCPH 14 con 0,54, 0,55 e 0,56 kg pt⁻¹ rispettivamente. Il valore minimo è stato di 0,06 kg pt⁻¹ (MCPH 25). Anche se dai dati analitici sei genotipi sono risultati più produttivi della varietà Spunta, il test di Duncan non ha identificato cloni con produzioni superiori a quelle della varietà di controllo. In accordo con

questo test statistico, infatti, le produzioni di 8 cloni nel 2002 e di 1 clone nel 2003, risultano statisticamente simili a quelle ottenute da Spunta.

Tab. 9 - Produzione per pianta di ibridi MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii*.

Genotipo	Produzione (kg pt ⁻¹)	
	2002	2003
MCT 1	0,09 ± 0,02 B	0,09 ± 0,05 D
MCOP 5	0,19 ± 0,11 B	0,24 ± 0,10 CD
MCPH 2	0,26 ± 0,11 B	0,24 ± 0,14 CD
MCPH 3	0,39 ± 0,15 AB	0,35 ± 0 BC
MCPH 5	0,14 ± 0,10 B	nd
MCPH 6	0,39 ± 0,16 AB	0,33 ± 0,10 BD
MCPH 7	0,58 ± 0,31 AB	0,32 ± 0,16 BC
MCPH 11	0,90 ± 0,72 A	0,40 ± 0,26 BC
MCPH 13	0,31 ± 0,27 B	0,39 ± 0,14 BC
MCPH 14	0,54 ± 0,31 AB	0,24 ± 0,06 CD
MCPH 15	0,18 ± 0,15 B	0,27 ± 0,03 CD
MCPH 16	0,29 ± 0,07 B	0,40 ± 0,18 BC
MCPH 18	0,33 ± 0,20 B	0,35 ± 0,19 BC
MCPH 19	0,17 ± 0,12 B	0,36 ± 0,16 BC
MCPH 20	0,56 ± 0,57 AB	0,39 ± 0,18 BC
MCPH 21	0,14 ± 0,06 B	0,26 ± 0,25 CD
MCPH 22	0,55 ± 0,29 AB	0,56 ± 0,12 AB
MCPH 25	0,06 ± 0,02 B	0,10 ± 0 D
MCPH 29	0,14 ± 0,06 B	0,18 ± 0,10 CD
MCPH 31	0,27 ± 0,17 B	0,22 ± 0,03 CD
MCPH 32	0,31 ± 0,14 B	0,18 ± 0,08 CD
MCPH 33	0,42 ± 0,63 AB	0,09 ± 0,04 D
MCPH 34	0,27 ± 0,33 B	nd
Spunta	0,40 ± 0,10 AB	0,67 ± 0,20 A

nd = non determinato

^a medie seguite dalla stessa lettera, in accordo con il test di Duncan, non differiscono statisticamente per $P \leq 0,01$.

L'ANOVA (tabella 10) ha evidenziato che i genotipi valutati hanno denotato differenze statisticamente significative sia nel 2002 (varianza = 198131,2, $P \leq 0,001$) che nel 2003 (varianza = 101495,1, $P \leq 0,001$).

Tab. 10 - Analisi della varianza per la produzione dei cloni MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii*. Le valutazioni sono state effettuate a Camigliatello Silano nel 2002 e 2003.

Fonte di variazione	g.l.		Varianza	
	2002	2003	2002	2003
Ripetizione	4	4	30165,5 n.s.	52164,1 n.s.
Cloni MCPH	22	21	198131,2**	101495,1**
Errore	88	84	77424,1	1577,1

n.s. = non significativo

g.l. = gradi di libertà

** $P \leq 0,001$

L'ANOVA combinata per i due anni di sperimentazione (tabella 11) ha indicato un effetto significativo solo per l'interazione fra i cloni MCPH e l'anno. A differenza dell'ANOVA combinata elaborate per i cloni NC, non è stata individuata alcuna differenza significativa per i cloni.

Tab. 11 - Analisi combinata della varianza degli ibridi MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* per la produzione per pianta nel 2002 e 2003

Fonte di variazione	g.l.	Varianza
Ripetizione	4	11938,4
Anno	1	67305,0
Errore	4	87472,1
Cloni MCPH	21	215943,4
Cloni MCPH × anno	21	848229,5**
Errore	68	45325,5

n.s. = non significativo; ** = $P \leq 0,01$; g.l. = gradi di libertà

I dati relativi alla precocità dei cloni NC sono riassunti nella figura 12. Gli ibridi NC hanno mostrato un andamento del ciclo biologico, durante i giorni della sperimentazione, paragonabile ai parentali 4x. Viceversa i parentali 2x *S. phureja*-*S. tuberosum* si sono distinti per una maggiore precocità a 50 e a 90 giorni ed una maggiore

tardività a 70 giorni. Il materiale vegetale diploide ha quindi mostrato ciclo biologico completo più breve ed una fioritura lunga rispetto ai parentali tetraploidi e alla progenie. Anche gli ibridi MCPH sono stati valutati per tale parametro.

I valori medi riportati dagli ibridi *S. tuberosum*–*S. commersonii* nei tre rilievi (1,91 a 50 giorni; 1,94 a 70 giorni e 2,65 a 90 giorni), danno una chiara idea della maggior lunghezza del ciclo biologico di questo materiale. Da precisare che la variabilità riscontrata per questo parametro e per questo gruppo è stata molto limitata.

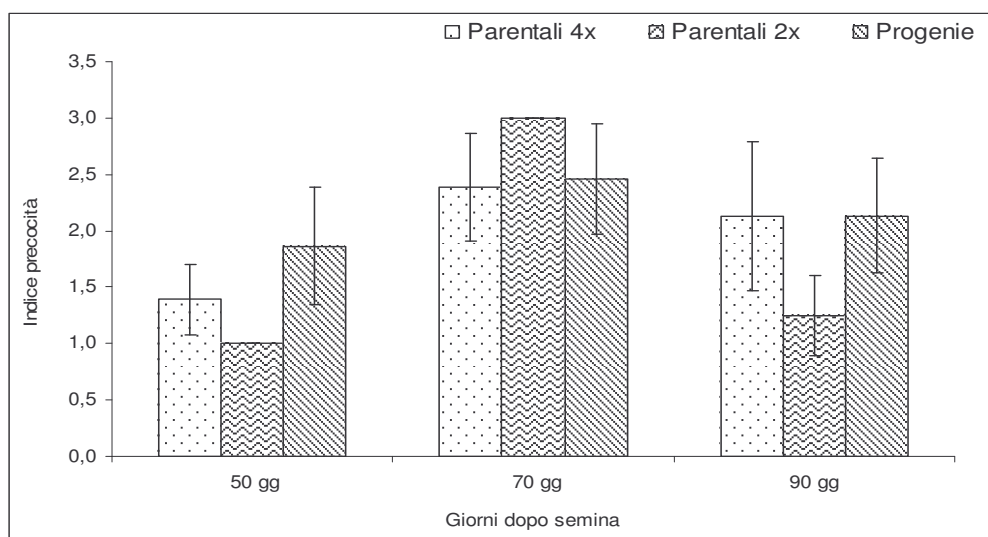


Fig. 12 - Precocità media degli ibridi NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*

5.2 Valutazione fenotipica dei tuberi

I dati morfologici relativi ai cloni NC e MPCH sono riportati in allegato 2 e riassunti nella figura 13.

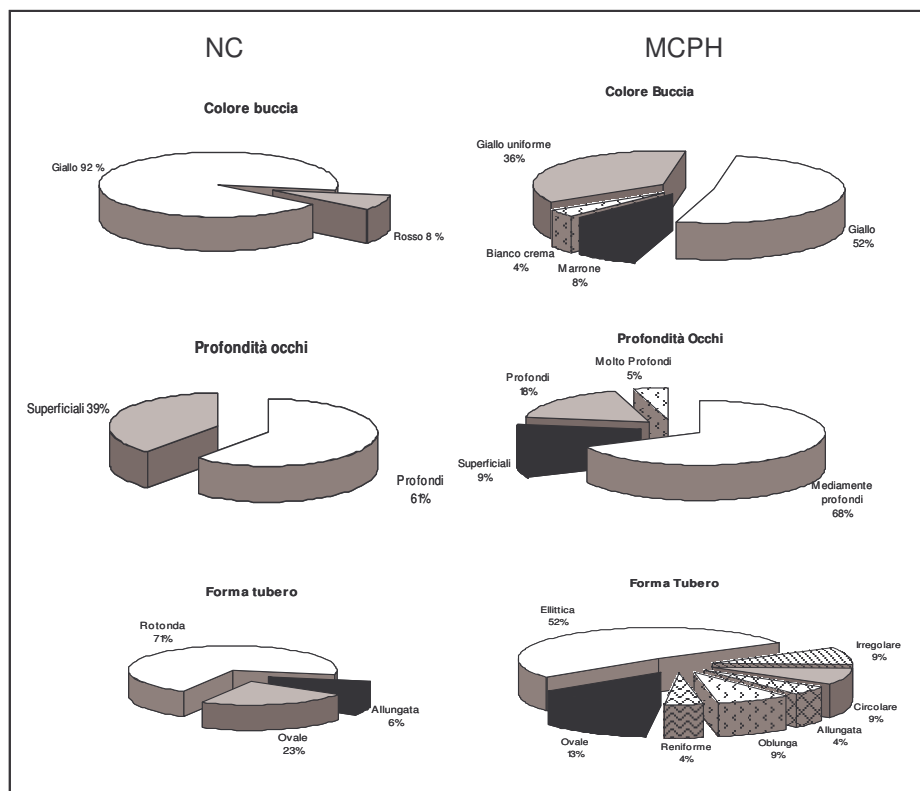


Fig. 13 - Sintesi delle caratteristiche morfologiche dei tuberi dei cloni NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* (sinistra) e dei cloni MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii*.

Per gli ibridi NC è stata trovata una elevata variabilità; infatti i dati morfologici possono essere riassunti come segue: il 92% degli ibridi ha presentato buccia gialla e l'8% buccia rossa; il 61% ha occhi profondi e il 39% ha occhi superficiali; infine, il 71% forma tonda del tubero, il 23% forma ovale e il 6% forma allungata. Interessante osservare che molti dei cloni derivanti da parentale 4x con buccia rossa hanno presentato buccia gialla: 10 dei 13 cloni della famiglia NC 5; 6 dei 12 cloni della famiglia NC 23 e 17 dei 21 cloni della famiglia NC 25. Nella progenie ottenuta da NC 10, non è stato osservato nessun clone con la buccia rossa. Anche dall'osservazione morfologica degli ibridi MCPH è emersa ampia variabilità. La forma

del tubero è risultato un carattere altamente eterogeneo e il 52% dei genotipi ha evidenziato forma ellittica del tubero. Il colore della buccia non è stato molto variabile, con l'88% dei genotipi mostrante una colorazione giallo uniforme. Gli occhi sono stati nel 68% dei cloni mediamente profondi, nel 18% dei casi profondi, nel 5% molto profondi e soltanto nel 9% dei casi superficiali, caratteristica ritenuta favorevole.

5.3 Valutazione del peso specifico dei tuberi

Il peso specifico di ognuno dei 59 genotipi NC analizzati è riportato nella figura 15. Il valore medio del peso specifico è stato di 1,093, superato da 33 genotipi (il 56% degli analizzati). Interessante notare che l'89% dei cloni ha superato il valore minimo (1,080) necessario per indirizzare una cultivar di patata alla trasformazione industriale. Tuttavia anche il restante 11% dei cloni ha presentato un peso specifico di poco inferiore al limite suddetto. I valori minimi sono stati evidenziati da NC 9-14 (1,071) e da NC 28-5 e NC 17-1 (1,072).

Tutti i 18 ibridi MCPH testati hanno mostrato un elevato valore di peso specifico. Come si evince dalla figura 14, la media del peso specifico degli ibridi MCPH è stata di 1,106 ed è stata superata da 11 genotipi (il 61% degli analizzati). MCT 1 con 1,128 ha fatto registrare il dato più elevato, seguito da MCPH 2 (1,125) ed MCPH 14 (1,119).

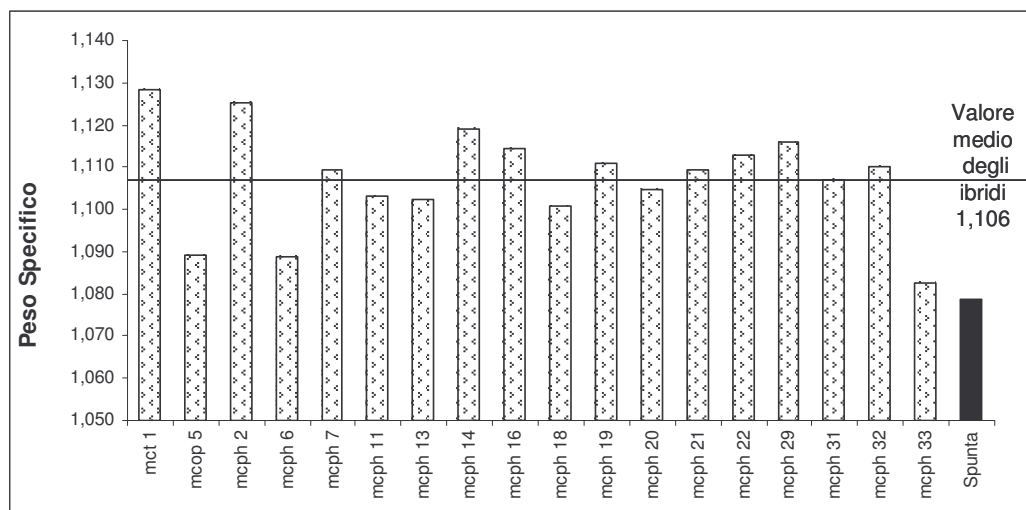


Fig. 14 - Peso specifico dei tuberi di alcuni cloni MCPH *Solanum tuberosum* - *Solanum commersonii*. È riportato anche il dato del controllo "Spunta"

5.4 Valutazione del contenuto e del trasporto di vitamina C

La stima del contenuto in vitamina C di 153 cloni NC, 4 parentali tetraploidi (LC00116, Atzimba, Carmine, MC330) e 2 dei parentali diploidi (UP88-P5 e I) è stata effettuata mediante metodo colorimetrico, metodo veloce ed economico e idoneo ad uno screening di massa. In figura 16 sono riportati i valori espressi in percentuale rispetto alla media dei parentali. Da notare la tendenza di molti cloni NC ad avere un contenuto in vitamina C superiore ai parentali tetraploidi e più vicino al contenuto mostrato dai parentali diploidi (media 407%). Fra i cloni particolarmente ricchi di tale molecola, sono da segnalare: NC 27-8 (542%) e NC 10-16 (482%).

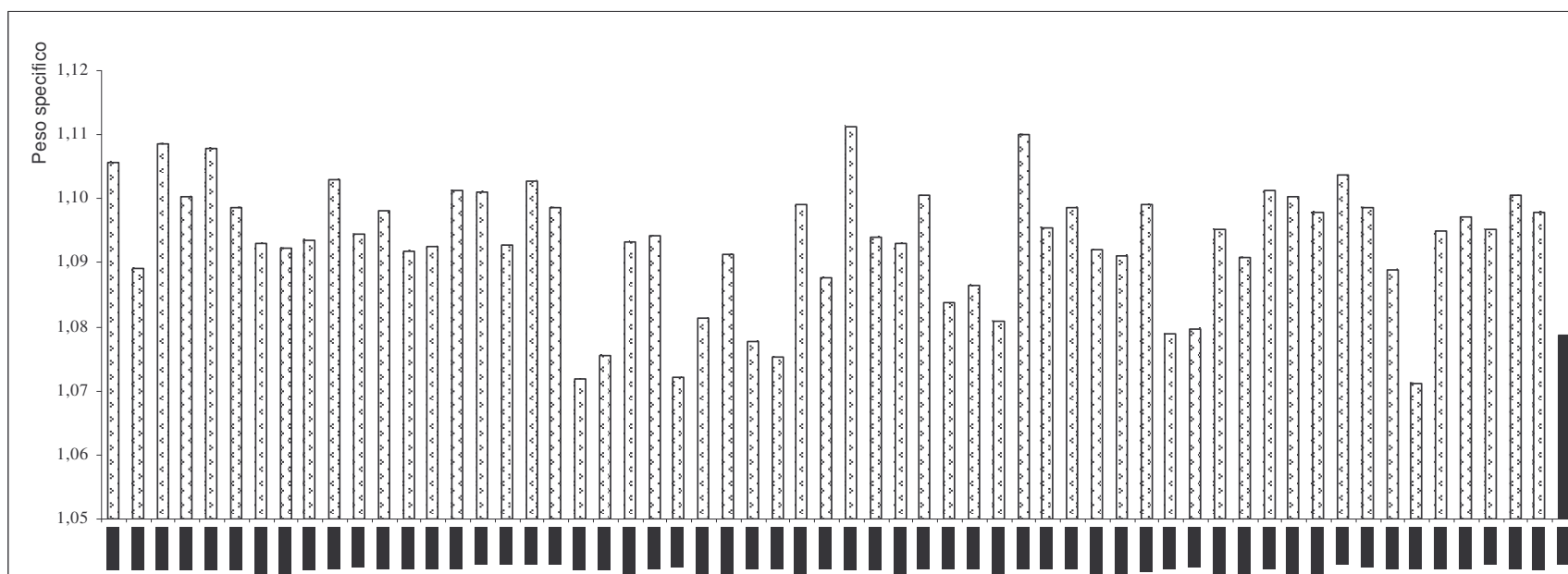


Fig. 15 - Peso specifico dei tuberi di alcuni cloni NC *Solanum tuberosum* - *Solanum phureja*. È riportato anche il dato del controllo "Spunta"

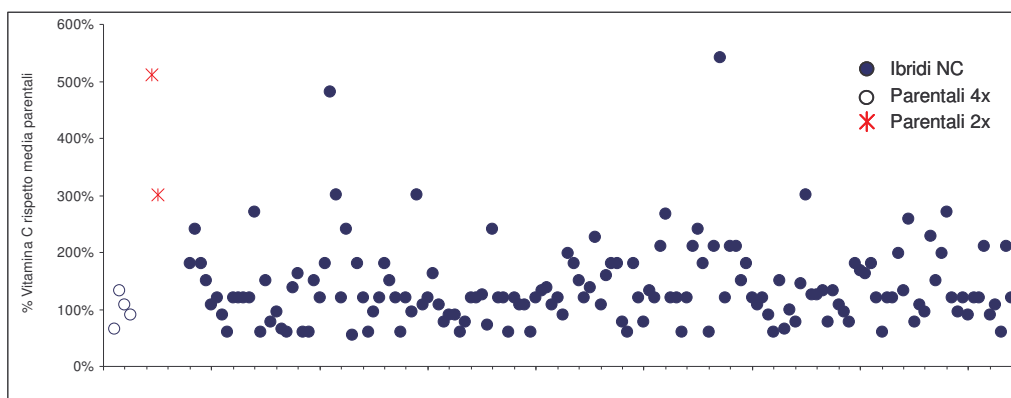


Fig. 16 - Contenuto in di vitamina C degli ibridi NC *Solanum tuberosum* – *Solanum phureja* espresso in percentuale rispetto al valore medio fatto registrare dai parentali 4x

Nella tabella 12 è indicato il numero di cloni con un contenuto di vitamina C superiore al parentale tetraploide. Interessanti risultano essere le famiglie NC 23 e NC 25 in quanto hanno prodotto rispettivamente l'83% e il 90% della progenie con un contenuto medio di vitamina C superiore al parentale femminile tetraploide. Il dato riferito alla prima famiglia aumenta d'interesse se si considera che il parentale tetraploide è fra i quelli con più alto contenuto in vitamina C.

Il metodo colorimetrico è stato applicato anche per la stima del contenuto di vitamina C di 23 cloni MCPH (figura 17). Nonostante l'ampia variabilità riscontrata fra gli ibridi, nessuno ha superato il contenuto della varietà di controllo utilizzata "Spunta". Dalla figura si evince una tendenza al ribasso del contenuto di vitamina C della progenie rispetto al controllo *S. tuberosum*. Tale decremento potrebbe essere dovuto all'apporto di germoplasma selvatico. *S. commersonii* non tuberizza alle nostre latitudini e quindi non è stato possibile testare il contenuto di vitamina C nei suoi tuberi.

Tab. 12 - Contenuto vitamina C nei tuberi delle famiglie NC *Solanum tuberosum* - *Solanum phureja* espresso in percentuale rispetto alla media dei parentali tetraploidi

Famiglia	N° cloni valutati	Percentuale vitamina C rispetto media parentali tetraploidi			N° cloni (%) > parentale femminile
		Parentali		Progenie	
		4x femminile	2x maschile		
NC 5	13	108%	301%	145%	10 (77%)
NC 10	16	66%	301%	143%	11 (69%)
NC 12	12	90%	301%	126%	9 (75%)
NC 15	17	-	301%	123%	-
NC 18	10	-	301%	108%	-
NC 21	18	133%	512%	139%	9 (50%)
NC 23	12	108%	512%	160%	10 (83%)
NC 25	21	66%	512%	134%	19 (90%)
NC 27	16	90%	512%	163%	13 (81%)
NC 30	18	-	512%	140%	-

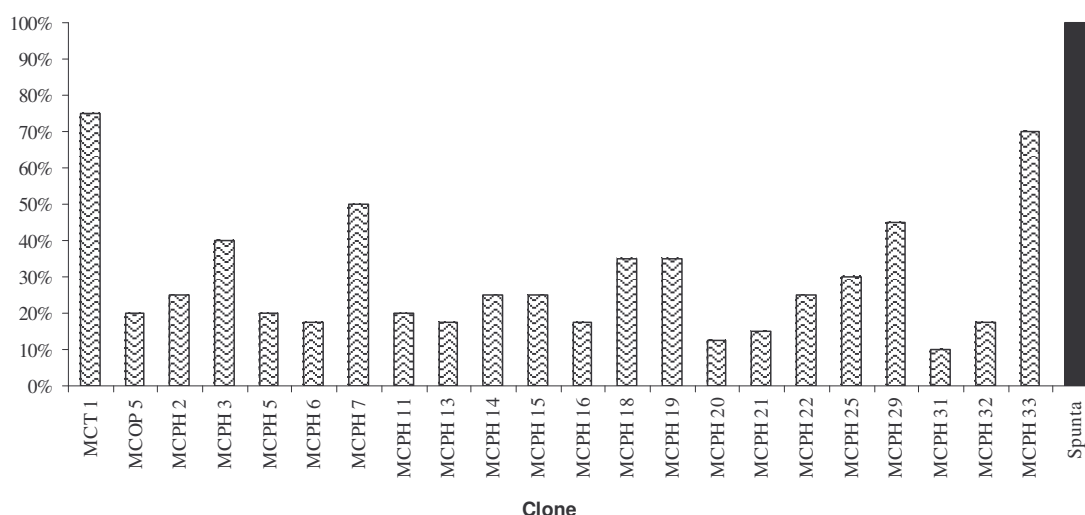


Fig. 17 - Contenuto in vitamina C nei tuberi di ibridi MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* espressi in percentuale rispetto al controllo "Spunta".

In figura 18 sono stati riportati i risultati relativi al contenuto di vitamina C in differenti organi della pianta dopo la somministrazione di precursori alle foglie. Il contenuto di vitamina C delle foglie "source" è stato di 2,2 volte superiore rispetto alle piante controllo alle

quali è stato fornito il D-Glc al posto del L-GalL. Il contenuto di vitamina C è significativamente aumentato anche negli organi “sink” quali i fiori (33%) nei stoloni tuberizzanti (80%) e tuberi in sviluppo (20%) rispetto al controllo. Nessun cambiamento nei livelli di vitamina C è stato osservato nei piccioli, negli steli, negli stoloni non tuberizzanti nelle foglie “sink” e nei tuberi in sviluppo.

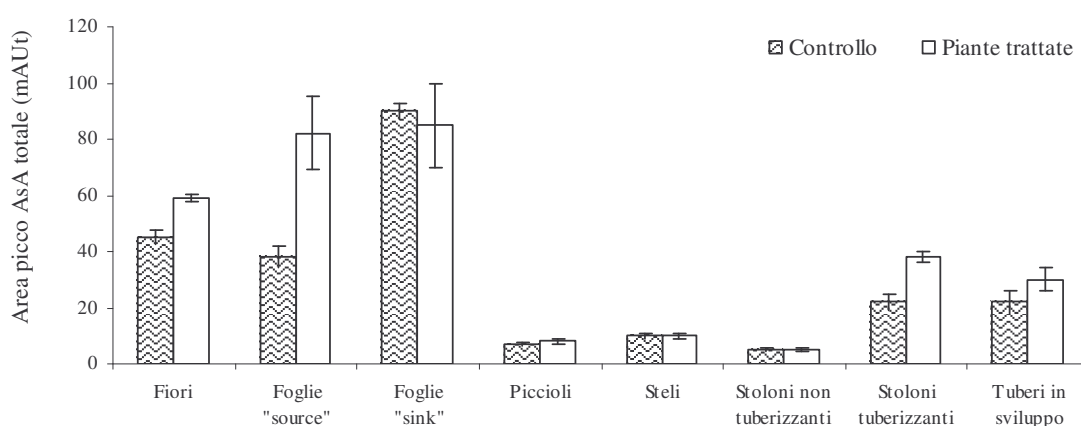


Fig. 18 – Effetto della tecnica “flap” sul contenuto di AsA totale in vari tessuti di patata. Trattamento Effettuato con 500 ml di buffer 20 mM MES pH 5,5, 2 mM CaCl₂ da solo (controllo) o contenente 25 mM L-GalL per 24 h. I tessuti raccolti sono stati liofilizzati ed estratti in 5% MPA, 5 mM TCEP (19:1 v/w) e in fine analizzati mediante HPLC. È inoltre indicato l’errore standard basato su 4 repliche. Gli istogrammi indicano l’area del picco relativo all’acido ascorbico totale espresso in mg/100gFW ad una assorbanza di 245 nm.

5.5 Valutazione della resistenza alla peronospora

Nella tabella 13 sono riportati i dati relativi a 19 cloni MCPH per la resistenza a *Phytophthora infestans*, agente della peronospora. Anche se non è stato individuato alcun genotipo totalmente resistente, dopo 4 giorni dall’inoculo è stato possibile distinguere gli ibridi in due grossi gruppi. Il primo ha presentato le foglioline completamente morte ed è stato quindi classificato suscettibile. In questo gruppo

vanno annoverati MCPH 15, MCPH 20, MCPH 24, MCPH 25 e, come atteso, Spunta.

Tab. 13 - Valutazione resistenza a *P.infestans** degli ibridi MCPH

Genotipo	Ø necrosi in mm	Valutazione
Spunta	T	S
MCPH 15	T	S
MCPH 20	T	S
MCPH 24	T	S
MCPH 25	T	S
MCPH 23	12,7	MR
MCOP 5	28,0	MS
MCPH 11	33,2	MS
MCPH 12	22,7	MS
MCPH 13	26,7	MS
MCPH 14	20,7	MS
MCPH 16	26,8	MS
MCPH 18	30,0	MS
MCPH 22	35,3	MS
MCPH 29	21,5	MS
MCPH 3	24,2	MS
MCPH 31	23,3	MS
MCPH 34	23,5	MS
MCPH 5	23,8	MS
MCPH 7	20,3	MS

T = tutta la fogliolina morta

* per il pool usato: Ph 747-748-826-842-921-936-948-951

MS = Mediamente suscettibile

MR = Mediamente resistente

S = suscettibile

All'interno del secondo gruppo, ossia delle piante che non hanno mostrato l'intera fogliolina morta, è possibile distinguere genotipi mediamente suscettibili con il diametro delle lesioni necrotiche superiore ai 30 mm (es. MCPH 22, MCPH 11, MCPH 18); genotipi poco suscettibili, con diametro medio delle lesioni compreso fra 29,9 e 22 (es. MCOP 5, MCPH 5, MCPH 3); da segnalare, infine, il genotipo

MCPH 12 il quale ha mostrato un diametro medio delle lesioni molto basso ed è stato classificato quindi come mediamente resistente.

5.6 Valutazione della resistenza al marciume molle dei tuberi

Centosei cloni NC sono stati testati per resistenza al marciume molle dei tuberi. Nella tabella 14 sono riportati i risultati relativi al test di resistenza; i dati sono stati raggruppati per famiglia. È interessante notare che, nonostante tutti i parentali 4x fossero risultati suscettibili e che i parentali 2x fossero risultati uno resistente (I, dimensione media

Tab. 14 – Diametro medio della lesione dopo inoculo artificiale con *Erwinia carotovora* ssp *carotovora* delle famiglie NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*. È riportato anche il diametro medio della lesione dei parentali ed il numero dei cloni resistenti per ciascuna famiglia

Famiglia	N° cloni valutati	Diametro medio della lesione (mm)			N° (%) ibridi resistenti *
		Parentali		progenie	
		4x femminile	2x maschile		
NC 5	9	7,4 ± 4,7	5,6 ± 2,9	6,6 ± 3,2	1 (11%)
NC 10	11	8,0 ± 3,3	5,6 ± 2,9	5,4 ± 2,9	4 (4%)
NC 12	8	8,0 ± 4,2	5,6 ± 2,9	6,1 ± 3,4	3 (38%)
NC 15	12	-	5,6 ± 2,9	5,6 ± 3,1	1 (8%)
NC 18	8	-	5,6 ± 2,9	7,3 ± 3,5	0 (0%)
NC 21	15	10,9 ± 3,9	3,2 ± 0,4	7,9 ± 3,9	1 (7%)
NC 23	10	7,4 ± 4,7	3,2 ± 0,4	7,5 ± 4,0	2 (20%)
NC 25	17	8,0 ± 3,3	3,2 ± 0,4	6,6 ± 3,8	3 (18%)
NC 27	12	8,0 ± 4,2	3,2 ± 0,4	7,8 ± 4,4	2 (17%)
NC 30	14	-	3,2 ± 0,4	5,8 ± 3,4	3 (21%)

* = sono stati considerati resistenti gli ibridi con un diametro medio della lesione < 4

diametro lesione 3,2 mm) e l'altro mediamente resistente (UP88-P5, dimensione media diametro lesione 5,6 mm), le famiglie NC presentano almeno un clone resistente a tale patogeno. L'unica eccezione è rappresentata dalla famiglia NC18. Nonostante la grande variabilità di risposta all'inoculo da parte dei cloni NC, il diametro

medio della lesione per ogni famiglia è risultato compreso tra 5,4 mm e 7,9. In particolare sono da segnalare le famiglie NC 10 e NC 30 le quali hanno fatto registrare valori medi per famiglia molto bassi, rispettivamente $5,4 \pm 2,3$ e $5,8 \pm 3,4$ mm. Sono stati identificati 20 cloni resistenti (17% totale dei cloni NC analizzati). Nella figura 19 è riportata la risposta all'inoculo di un ibrido resistente (NC 30-3) ed uno suscettibile (NC 12-9).

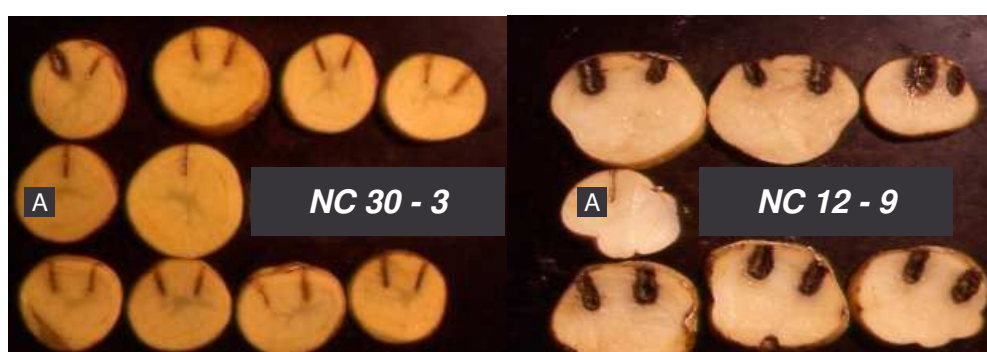


Fig. 19 - Esempio di genotipo resistente (NC 30-3) e suscettibile (NC 12-9) a marciume molle, dopo inoculo artificiale con *Erwinia carotovora* ssp *carotovora*. A = tuberi inoculati con acqua sterile

Nella tabella 15 sono mostrati i risultati relativi a tutti i cloni MCPH testati; dei 21 genotipi testati, 4 (MCPH 21, MCPH 13, MCPH 2 e MCPH 16) sono stati classificati resistenti, 6 genotipi sono stati classificati mediamente resistenti e 11 cloni hanno mostrato un diametro delle lesioni superiore a 6,1 mm e quindi sono stati considerati suscettibili. Particolarmente interessanti sono risultati gli ibridi MCPH 21 e MCPH 13 in quanto hanno mostrato sia i diametri medi delle lesioni (rispettivamente 3,2 e 3,3 mm), sia un valore di deviazione standard (0,7 per entrambi i genotipi) molto bassi.

Nella figura 18 sono indicate le percentuali dei cloni resistenti, mediamente resistenti e suscettibili degli ibridi NC e MCPH.

Nonostante la notevole diversa consistenza dei due gruppi (116 ibridi NC e 21 ibridi MCPH), è interessante notare come le percentuali dei cloni classificati resistenti, suscettibili e intermedi siano simili.

Tab. 15 - Diametro medio della lesione dopo inoculo artificiale con *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* di ibridi MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii*. Désirée è stato utilizzato come controllo.

Genotipo	Lesione media ¹ (mm)	Tipo di reazione
Controlli		
Désirée	7,2 ± 3,3 C	S
MCPH		
MCPH 21	3,2 ± 0,7 F	R
MCPH 13	3,3 ± 0,7 F	R
MCPH 2	3,9 ± 0,9 EF	R
MCPH 16	3,9 ± 2,8 EF	R
MCPH 14	4,7 ± 3,3 DEF	MR
MCPH 11	5,3 ± 2,0 DEF	MR
MCPH 15	5,3 ± 3,5 DEF	MR
MCPH 31	5,9 ± 4,2 CDE	MR
MCPH 20	5,9 ± 2,9 CDE	MR
MCPH 19	6,1 ± 4,3 CDE	MR
MCPH 7	6,8 ± 4,8 CD	S
MCPH 18	6,9 ± 3,3 CD	S
MCOP 5	7,5 ± 4,5 C	S
MCPH 29	7,5 ± 4,6 C	S
MCPH 32	7,6 ± 3,7 C	S
MCPH 6	8,1 ± 3,6 C	S
MCPH 22	11,2 ± 2,2 B	S
MCPH 3	11,5 ± 4,1 B	S
MCPH 25	14,1 ± 3,9 A	S
MCT 1	14,1 ± 3,8 A	S
MCPH 33	15,7 ± 1,6 A	S

R = resistente; MR = mediamente resistente; S = suscettibile

¹medie seguite da stesse lettere non sono statisticamente differenti con $P \leq 1\%$ in accordo con il test di Duncan

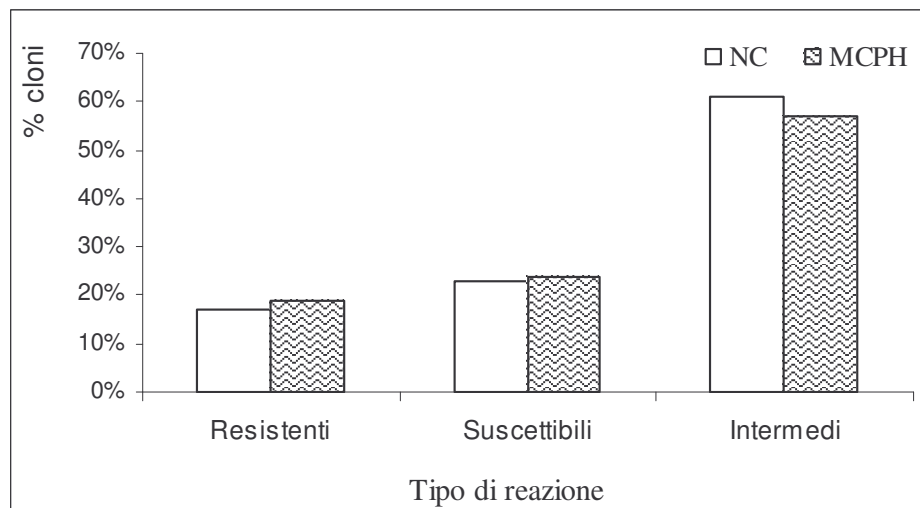


Fig. 18 - Classificazione degli ibridi NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* e MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* in funzione della risposta all'inoculazione con l'*Erwinia carotovora*

5.7 Valutazione della resistenza all'avvizzimento batterico

Gli ibridi testati per resistenza all'avvizzimento batterico sono stati seguiti per 20 gg dopo l'inoculo artificiale con il batterio (tab. 16). Grande variabilità è stata riscontrata fra gli ibridi in termini di andamento della malattia. Alcuni ibridi hanno mostrato una totale resistenza fino al 20 gg. Fra questi ibridi vanno segnalati MCPH 6, MCPH 19, MCPH 21, MCPH 23, MCPH 27 e MCPH 31 che hanno mostrato un indice di malattia molto basso (0,6), paragonabile al parentale selvatico *S. commersonii*. Interessante notare che lo sviluppo della malattia per alcuni genotipi è stato più lento rispetto ad altri. Un esempio ci è dato da MCPH 13 e MCPH 15 i quali, sebbene abbiano raggiunto un indice di malattia al 20° giorno simile (3,5), hanno però avuto un andamento diverso.

Tab. 16 - Indice medio di malattia rilevato negli ibridi MCPH *Solanum tuberosum* - *Solanum commersonii* in differenti giorni dopo l'inoculo. È riportato anche l'indice di malattia dei controlli Blondy e *Solanum commersonii*.

Genotipo	Giorni dall'inoculo					
	6 gg	9gg	12gg	15gg	17 gg	20gg
MCOP 5	0,0	0,0	0,5	1,3	1,3	1,3
MCPH 1	0,0	0,0	3,4	4,4	4,5	4,6
MCPH 2	0,0	0,1	0,8	1,3	1,3	2,0
MCPH 5	1,5	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5
MCPH 6	0,0	0,3	0,5	0,6	0,6	0,6
MCPH 7	0,3	0,6	1,0	1,6	1,6	1,9
MCPH 11	0,0	0,0	0,3	1,1	1,4	1,5
MCPH 13	0,1	1,4	1,9	2,6	3,5	3,5
MCPH 14	0,1	0,8	1,1	1,4	1,4	1,6
MCPH 14	0,9	1,6	2,0	2,6	3,3	3,8
MCPH 15	0,6	2,1	2,3	2,9	3,0	3,5
MCPH 16	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	2,1
MCPH 17	0,5	0,6	0,6	0,6	0,9	1,3
MCPH 17	0,5	1,1	1,3	1,3	1,5	2,3
MCPH 18	0,0	0,6	1,0	1,1	1,6	2,4
MCPH 18	0,9	2,9	3,5	3,8	3,8	3,8
MCPH 19	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
MCPH 20	0,1	0,3	0,5	0,8	0,9	1,1
MCPH 21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6
MCPH 21	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5	1,1
MCPH 22	0,1	0,4	1,0	1,3	1,8	1,9
MCPH 23	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,6
MCPH 24	0,0	1,0	3,1	3,1	3,1	3,1
MCPH 25	0,5	1,4	2,4	2,5	2,5	2,5
MCPH 27	0,0	0,0	0,3	0,4	0,5	0,6
MCPH 28	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	1,3
MCPH 29	0,5	1,4	1,9	2,5	2,6	3,0
MCPH 29	1,3	1,9	2,5	2,8	2,9	3,3
MCPH 30	0,3	1,5	1,9	1,9	2,1	2,5
MCPH 31	0,0	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6
MCPH 32	0,0	0,0	0,5	1,3	1,3	1,3
MCPH 32	1,1	1,6	2,3	2,8	3,0	3,6
MCPH 33	0,0	0,1	1,1	1,9	1,9	2,4
MCPH 34	0,1	0,4	0,9	1,2	1,4	1,7
MCPH 34	1,0	1,8	2,3	2,5	2,6	2,8
MCPH 35	0,6	3,3	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>S. commersonii</i>	0,0	0,0	0,1	0,2	0,4	0,4
Blondy	1,9	2,1	2,5	4,6	4,6	5,0

Nella figura 19 viene indicato l'andamento della malattia durante i 20 giorni di test. Nella fig. 19A sono messi a confronto gli ibridi MCPH con i parentali *S. commersonii* e *S. tuberosum* (cv.

Blondy) e con una progenie MCPH x *S. tuberosum*. È evidente che, a fronte del incremento della percentuale del genoma coltivato, la generazione BC₂ ha ottenuto un indice di malattia medio leggermente superiore rispetto alla generazione precedente. Nella figura 19B invece sono stati messi a confronto gli andamenti mostrati da due ibridi resistenti, da due ibridi suscettibili e dei parentali.

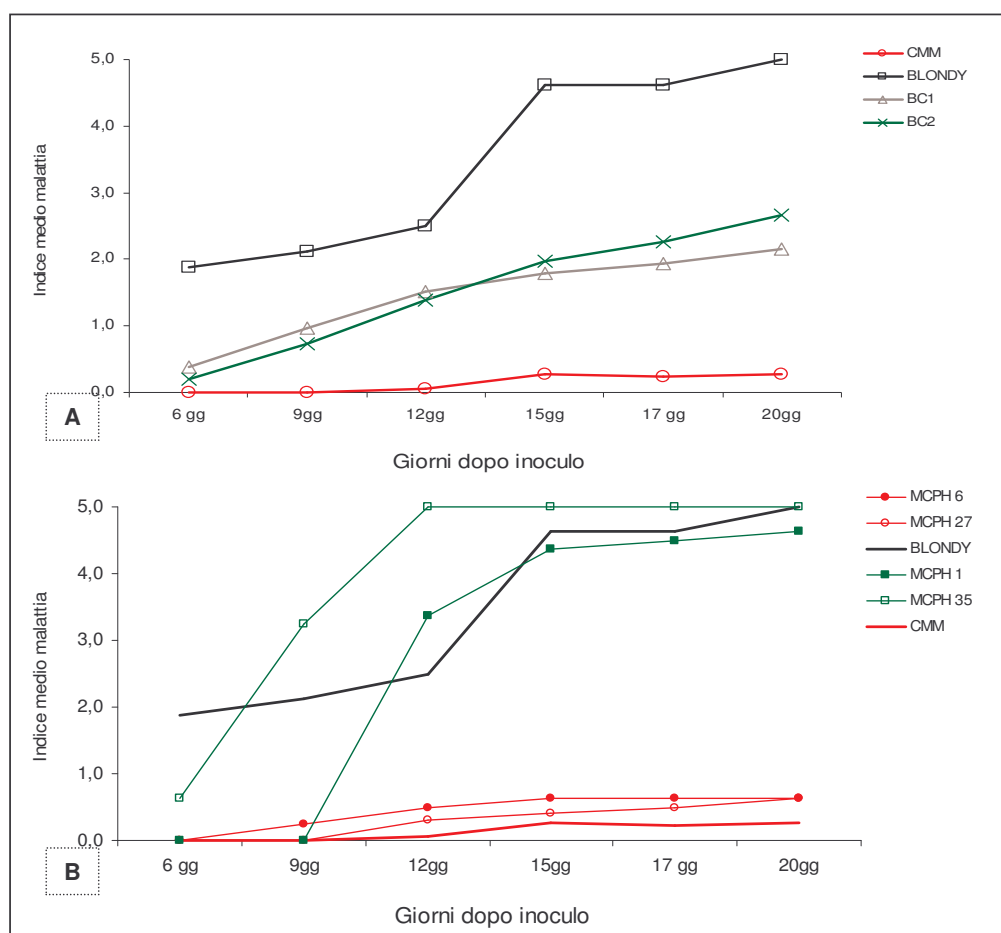


Fig. 19 - Andamento dell'indice di malattia dopo inoculo artificiale con *Ralstonia solanacearum*. I rilievi sono stati fatti a 6 – 20 giorni dall'inoculo. **A:** confronto fra i parentali *S. commersonii*, Blondy, gli ibridi MCPH *S. tuberosum* – *S. commersonii* e un campione di ibridi MCPH x *S. tuberosum*. **B:** confronto tra un campione di ibridi MCPH *S. tuberosum* – *S. commersonii* resistente ed uno suscettibile. Il controllo resistente è *S. commersonii*.

Con gli indici di malattia determinati al 20°giorno sono stati calcolati gli indici di Mc Kinney (MK) (tabella 17). I genotipi sono

stati quindi classificati in resistenti, mediamente resistenti e suscettibili in funzione dell'indice MK attribuito.

Tab. 17 - Valutazione della resistenza all'appassimento batterico da *Ralstonia solanacearum* negli ibridi MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* mediante determinazione dell'indice Mc Kinney.

Genotipi	Indice Mc Kinney	Tipo di reazione
Controlli		
<i>S. commersonii</i>	0,4	R
Adora	3,9	S
Blondy	5,0	S
Ibridi		
MCPH 19	0,6	R
MCPH 23	0,6	R
MCPH 27	0,6	R
MCPH 31	0,6	R
MCPH 6	0,6	R
MCPH 21	0,9	R
MCPH 20	1,1	MR
MCOP 5	1,3	MR
MCPH 28	1,3	MR
MCPH 34	1,3	MR
MCPH 11	1,5	MR
MCPH 17	1,8	MR
MCPH 7	1,8	MR
MCPH 22	1,9	MR
MCPH 2	2,0	MR
MCPH 16	2,1	MR
MCPH 33	2,4	MR
MCPH 32	2,4	MR
MCPH 25	2,5	S
MCPH 5	2,5	S
MCPH 14	2,7	S
MCPH 34	2,8	S
MCPH 18	3,1	S
MCPH 24	3,1	S
MCPH 29	3,1	S
MCPH 13	3,5	S
MCPH 15	3,5	S
MCPH 1	4,6	S
MCPH 35	5,0	S

R = Resistente; MR = Mediamente resistente; S = Suscettibile

Sei ibridi sono risultati particolarmente interessanti in quanto hanno ottenuto un indice MK inferiore ad 1 (MK = 0,63 in MCPH 19, MCPH 23, MCPH 27, MCPH 31 e MCPH 6; MK = 0,88 in MCPH 21) e sono stati quindi classificati resistenti. Mentre dei restanti 23 genotipi, 12 sono stati classificati mediamente resistenti e 11 come suscettibili.

Nella tabella 18 è indicato il grado di dominanza relativo alla resistenza a questa patologia. Per determinare tale valore, sono stati testati anche il parentale triploide (MCA 1) che ha dato origine agli ibridi MCPH oggetto della tesi e 11 ibridi BC₂ MCPH x *S. tuberosum*.

Tab. 18 - Grado di dominanza relativo alla resistenza a *R. solanacearum* per gli ibridi MCPH *S. tuberosum* - *S. commersonii* e per una progenie MCPH x *S. tuberosum*.

Parentale resistente	Indice medio malattia			Grado di dominanza
	Progenie	Parentali		
		<i>Resistente</i>	<i>Suscet.</i>	
F1	1.4	0.4	1.85	-0.31
BC ₁	2.2	1.4	4.1	-0.41
BC ₂	2.7	1.3	4.1	-0.07

I valori negativi del periodo di dominanza suggeriscono una dominanza fenotipica del genitore resistente. Non essendoci valori maggiori, in valore assoluto, di 1 sono da escludere situazioni di superdominanza.

5.8 Analisi delle componenti principali

I risultati ottenuti con la caratterizzazione dei cloni NC e MCPH sono stati utilizzati per l'analisi delle componenti principali (PCA). Nel nostro caso degli ibridi NC le variabili considerate sono state 6 (tabella 19).

Tab. 19 - Comunalità dei cloni NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja* considerate per l'analisi delle componenti principali

Variabile	Iniziale	Estratta
Resistenza <i>Erwinia carotovora</i> ssp <i>carotovora</i>	1,000	0,345
Precocità a 90 giorni	1,000	0,635
Profondità occhi	1,000	0,720
Forma tubero	1,000	0,720
Media produzione nel biennio	1,000	0,822
	1,000	
Media numero tuberi nel biennio		0,829

Esprimendo il 67% (tabella 20) dell'intera variabilità, sono stati determinati 3 fattori (tabella 21) che possono essere espressi in funzione delle variabili che descrivono: 1) Produzione; 2) Forma del tubero e precocità; 3) Profondità degli occhi e resistenza al marciume molle. In particolare, ad un maggior valore del fattore 1 corrisponde una più alta produzione media del biennio in esame, sia in termini di numero di tuberi che in termini di peso; ad un più alto valore del fattore 2 corrisponde un ciclo vegetativo più lungo e una forma del tubero che va dal tondo ad allungata; ad un più alto valore del fattore

3, infine, corrispondono occhi profondi ed una maggiore resistenza al marciume molle dei tuberi.

Tab. 20 - Varianza totale spiegata mediante l'analisi delle componenti principali

Variabile	Somma ruotata dei pesi quadratici		
	Totale	% varianza	% cumulativa
Resistenza <i>Erwinia carotovora</i>	1,745	29,087	29,087
Precocità a 90 giorni	1,219	20,313	49,401
Profondità occhi	1,093	18,222	67,623

Metodo di estrazione: Analisi delle componenti principali

È da precisare, tuttavia, che quest'ultima caratteristica è spiegata solo per il 34,5 % della sua variabilità dal fattore 3 (tabella 21). Dalla PCA (figura 20) è emerso che tutte le famiglie presentano un fattore 2 più basso rispetto ai parentali 4x, ma generalmente superiore ai parentali 2x; l'unica eccezione è la famiglia NC 30, che ha presentato valori del fattore 2 pressoché simili.

Tab. 21 - Matrice componente ruotata ^a

Variabile	Componente		
	1	2	3
Resistenza <i>Erwinia carotovora</i> ssp <i>carotovora</i>	0,206	-0,071	-0,545
Precocità a 90 giorni	0,159	0,738	0,256
Profondità occhi	0,230	-0,077	0,813
Forma tubero	-0,072	0,810	-0,212
Media produzione nel biennio	0,895	0,087	-0,120
Media numero tuberi nel biennio	0,905	-0,002	0,102

Metodo di estrazione: Analisi delle componenti principali.

Metodo di rotazione: Varimax con normalizzazione di Kaiser

^a = Rotazione convergente in 4 iterazioni

Per il fattore 1, invece, bisogna distinguere due gruppi di famiglie. In un gruppo sono incluse tutte le famiglie che hanno presentato almeno un clone più produttivo del miglior parentale 4x

(famiglie NC 23; NC 12; NC 15); nell'altro le famiglie per le quali è si verificato il contrario (NC 30; NC 27; NC 25; NC 5; NC 10; NC 18; NC 21). Come ci si attendeva, tutte le famiglie hanno mostrato una grande variabilità per questo fattore. I parentali, sia tetraploidi che diploidi, hanno mostrato un valore simile del fattore 3, mentre la progenie di tutte le famiglie ha riportato un valore leggermente più alto.

L'analisi PCA è stata effettuata anche per i cloni MCPH. In tabella 22 sono indicate le 8 variabili prese in esame per questa analisi.

Tab. 22 - Comunalità dei cloni MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* considerate per l'analisi delle componenti principali.

Variabile	Iniziale	Estratto
Resistenza a <i>Ralstonia solanacearum</i>	1,00	0,78
Resistenza a <i>Phytophthora infestans</i>	1,00	0,53
Resistenza a <i>Erwinia carotovora</i>	1,00	0,58
Profondità occhi	1,00	0,64
Lunghezza stoloni	1,00	0,69
Vitamina C	1,00	0,72
Peso Specifico	1,00	0,73
Produzione media	1,00	0,78

Metodo di estrazione: Analisi delle Componenti Principali

A differenza della medesima analisi effettuata per i cloni NC, in questo caso sono stati determinati 3 fattori (tabella 23) che esprimono circa il 68% (tabella 24) della variabilità complessiva. Il fattore 1 descrive la produzione, la profondità degli occhi, la lunghezza degli stoloni e la resistenza ad *Erwinia carotovora*; il fattore 2 descrive la resistenza sia a *Ralstonia solanacearum* che a *Phytophthora infestans*

ed il contenuto in vitamina C; il fattore 3 il peso specifico e la produzione media nel biennio 2002 - 2003.

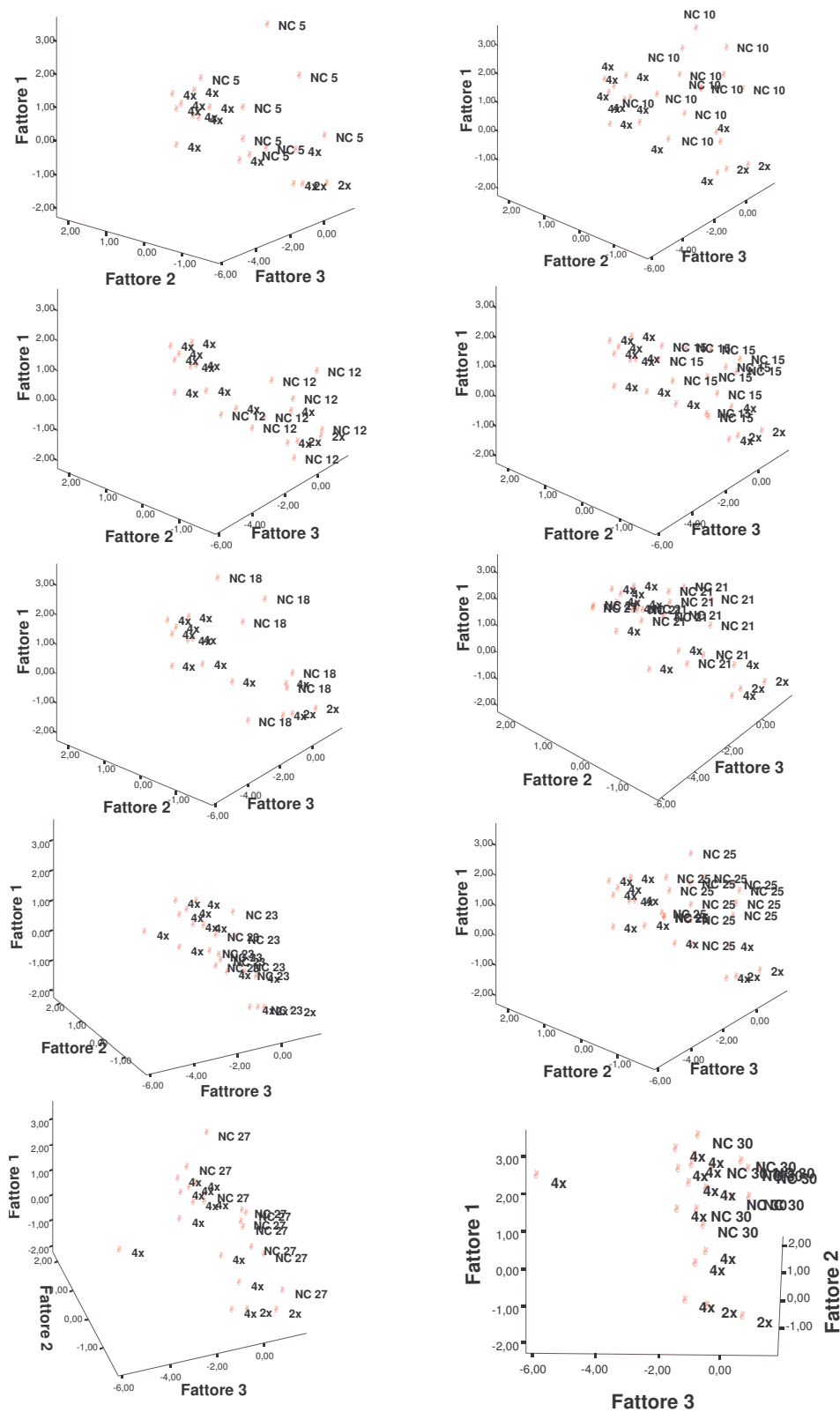


Fig. 20 – Analisi delle componenti principali per le famiglie NC *Solanum tuberosum*-*Solanum phureja*.

Tab. 23 - Varianza totale spiegata mediante l'analisi delle componenti principali

Componente	Somma ruotata dei pesi quadratici		
	Totale	% varianza	% cumulativa
Resistenza a <i>Ralstonia solanacearum</i>	2,411	30,142	30,142
Resistenza a <i>Phytophthora infestans</i>	1,632	20,403	50,545
Resistenza a <i>Erwinia carotovora</i>	1,397	17,459	68,004

Metodo di estrazione: Analisi delle Componenti Principali

Tab. 24 - Matrice componente ruotata ^a

Variabile	Componente		
	1	2	3
Lunghezza stoloni	0,831	0,004	-0,003
Profondità occhi	0,788	-0,043	0,115
Resistenza a <i>Erwinia carotovora</i>	-0,683	0,233	0,246
Resistenza a <i>Ralstonia solanacearum</i>	-0,100	0,863	-0,145
Resistenza a <i>Phytophthora infestans</i>	0,028	0,692	0,232
Vitamina C	-0,532	0,582	0,309
Peso specifico	0,281	-0,079	-0,801
Produzione media	0,512	0,093	0,715

Metodo di estrazione: Analisi delle Componenti Principali

^a Rotazione convergente in 5 iterazioni

Ad un più alto valore del fattore 1 corrispondono occhi più profondi, stoloni più lunghi e maggiore resistenza a *Erwinia carotovora*; ad un più elevato fattore 2 una minore resistenza sia all'appassimento batterico che alla peronospora ed un maggiore contenuto in vitamina C. Ad un maggiore valore del fattore 3 corrisponde un più basso valore del peso specifico ed una maggiore produzione media. I 3 fattori dell'analisi PCA sono riassunti nelle figure bidimensionali 21A e 21B. A differenza dell'analisi PCA precedentemente effettuata per i cloni NC, per meglio esprimere i dati, si è deciso di rappresentare i fattori su due grafici bidimensionali.

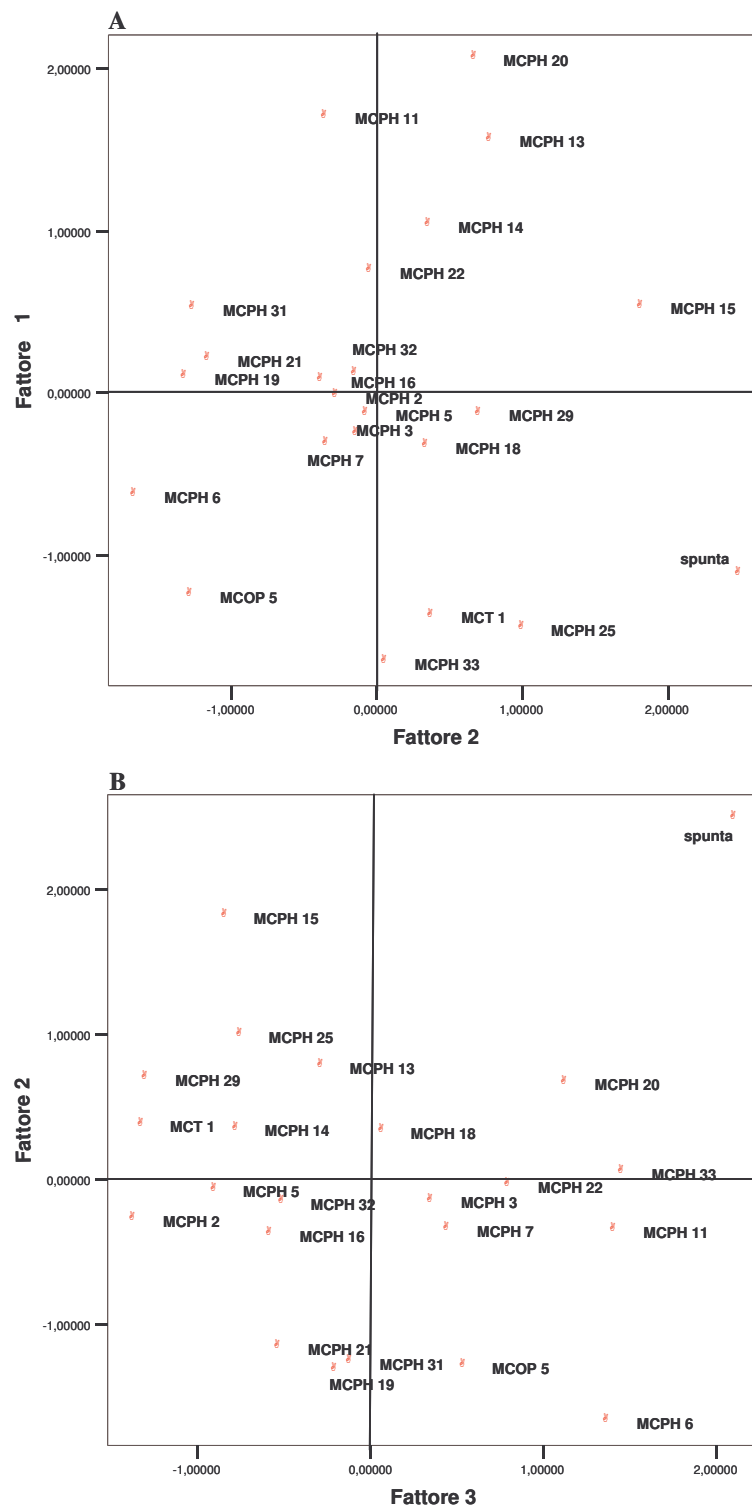


Fig. 21 – Analisi delle componenti principali (PCA) dei cloni MCPH. Nella figura A sono rappresentati i fattori 1 e 3, mentre nella figura B sono rappresentati i fattori 2 e 3.

Tutti i cloni MCPH si sono distinti dal controllo *S. tuberosum* utilizzato (Spunta). Nella figura 21A si evidenzia una maggiore concentrazione dei cloni con un valore prossimo allo zero per i fattori 1 e 2. Si distinguono particolarmente i cloni MCPH 33, MCT 1 e MCPH 25 per un bassissimo valore del fattore 1 e MCPH 20, MCPH 11 e MCPH 13 per un elevato valore del medesimo fattore. Nella figura 21B è interessante constatare che rispetto al controllo Spunta, tutti i cloni MCPH mostrano una tendenza nei valori dei fattori 3 e 2 opposta. Spunta, infatti, è stato il solo genotipo ad evidenziare un elevato valore per entrambi i fattori.

5.9 Analisi AFLP e indice di valutazione

Le analisi AFLP delle progenie MCPH con 6 combinazioni di primer (figura 22) hanno indicato una percentuale di bande *S. commersonii* specifiche variabile dal 4% (MCPH 24) al 53% (MCPH 20) (figura 23). Nella figura 24 sono indicati gli indici di valutazione ed il relativo contenuto di genoma selvatico per gli ibridi MCPH. Gli ibridi con un elevato punteggio di valutazione ed una bassa percentuale di AFLP *S. commersonii* specifici, ossia quelli cerchiati nella figura 23 (MCPH 16, MCPH 31, MCPH 19 e MCPH 11), sono stati selezionati per futuri schemi d'incrocio. Questi ibridi infatti sono quelli che presentano il maggior numero di caratteristiche positive e contemporaneamente il minor contenuto di genoma selvatico.

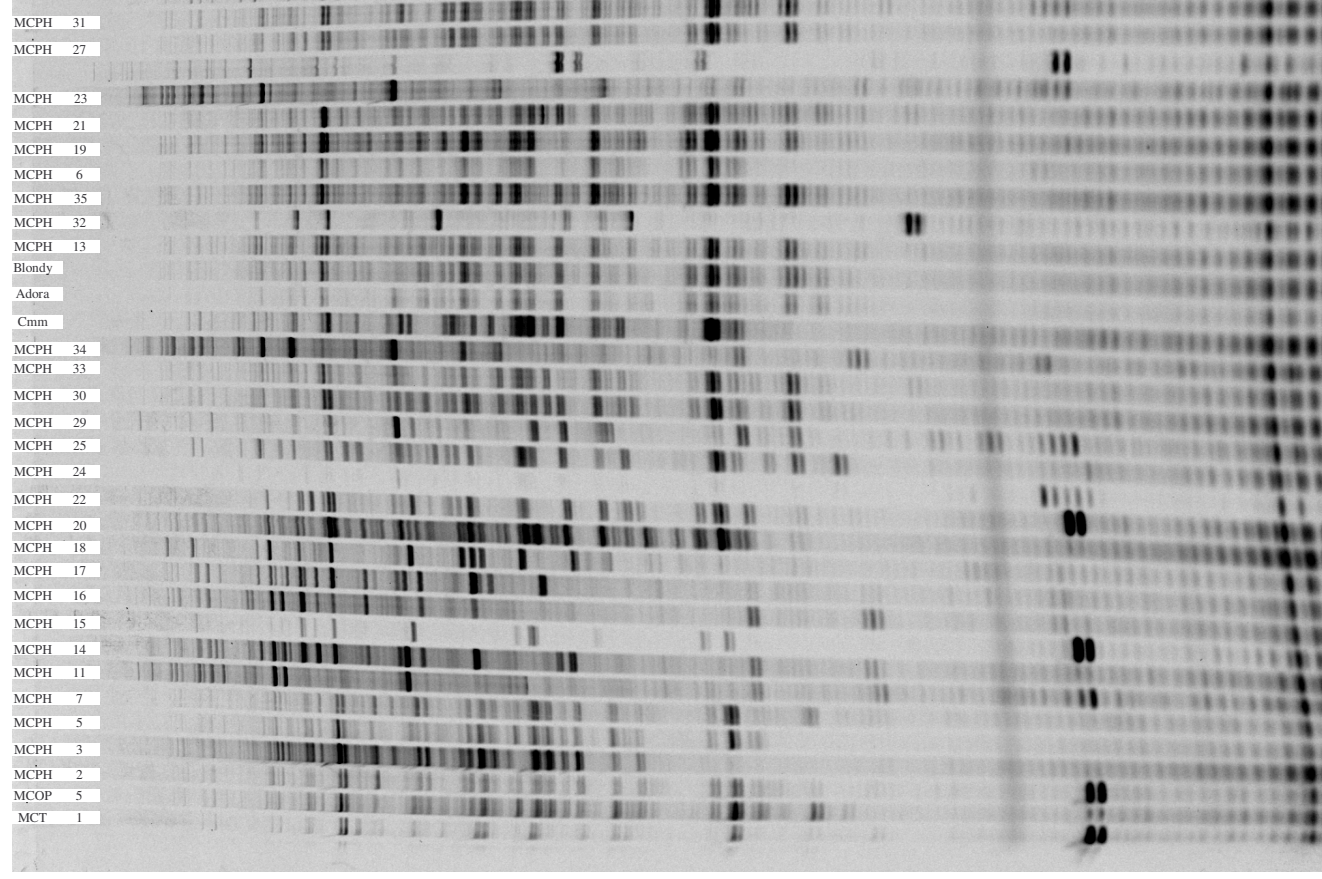


Fig. 22 – Gel AFLP ottenuto con marcatori fluorescenti sugli ibridi MCPH *Solanum tuberosum-Solanum commersonii*, sulle cultivar Adora e Blondy e sulla specie selvatica *Solanum commersonii*.

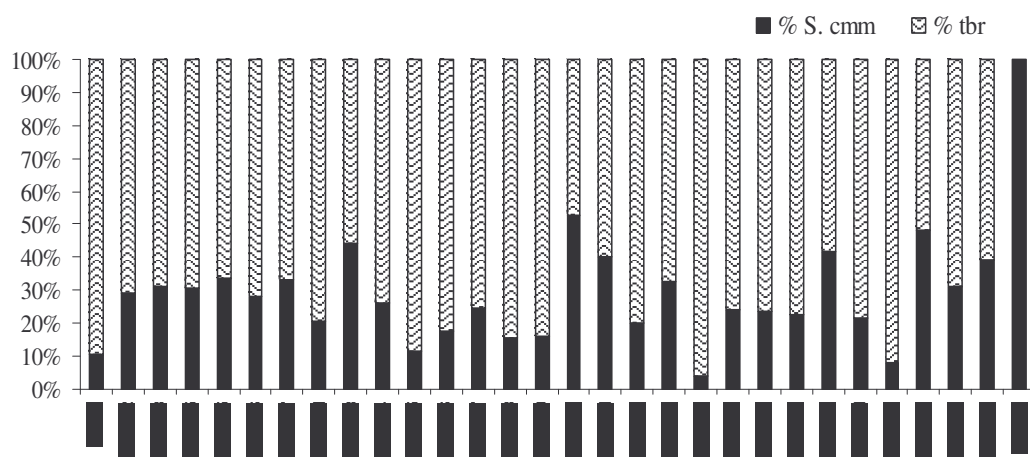


Fig. 23 – Percentuale di bande AFLP *S. commersonii* specifiche di ibridi MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii*.

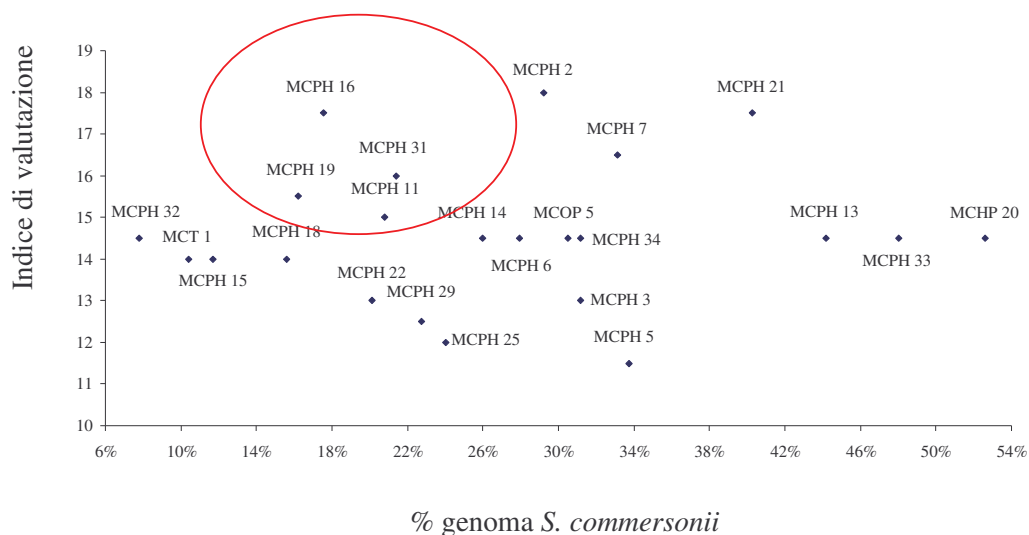


Fig. 24 – Dispersione di 23 ibridi MCPH *Solanum tuberosum* – *Solanum commersonii* in funzione della loro percentuale di genoma selvatico determinato mediante AFLP e dell'indice di valutazione. In rosso sono cerchiati gli ibridi selezionati per successivi programmi di reincrocio.

6. Discussione

La domesticazione delle piante coltivate ha visto una progressiva e costante diminuzione della variabilità genetica delle stesse. La selezione per caratteri quantitativi, inoltre, ha determinato la perdita di numerosi caratteri qualitativi e di conseguenza una diminuzione della variabilità genetica nel germoplasma coltivato. L'uso delle risorse genetiche (ecotipi, specie selvatiche, vecchie varietà) può contribuire ad invertire questa tendenza, soprattutto in considerazione del fatto che con le nuove tecnologie tale uso può essere molto efficiente.

In patata l'utilizzazione delle specie selvatiche nell'ibridazione interspecifica è tuttavia subordinato alla conoscenza e all'impiego di differenti strategie in quanto queste specie possono presentare, indipendentemente dal livello di ploidia, un differente valore di EBN. Prima di iniziare un'attività di miglioramento genetico è quindi importante conoscere tutte le caratteristiche riproduttive e genetiche e le peculiarità della specie selvatica che s'intende sfruttare come fonte di variabilità genetica.

In questa tesi sono stati caratterizzati genotipi derivanti da due differenti strategie di ibridazione sessuale basata su manipolazioni genomiche. Entrambi i gruppi di materiale genetico sono riconducibili a progenie BC₁. Gli ibridi NC derivano dal reincrocio di cloni diploidi *S. tuberosum*-*S. phureja* con cultivar/cloni in avanzata fase di selezione. Gli ibridi MCPH derivano da reincroci tra ibridi triploidi *S. tuberosum*-*S. commersonii* con la cultivar "Blondy". Gli ibridi NC presentano il 25% di genoma selvatico e sono tetraploidi. Viceversa, gli MCPH presentano un più elevato contenuto di genoma selvatico

(circa il 65%) e sono pentaploidi/aneuploidi pentaploidi (Carputo 2003).

Il lavoro svolto in questa tesi è stato finalizzato alla valutazione delle tipologie di materiale per caratteristiche agronomiche e per la resistenza a stress biotici, in modo da selezionare genotipi superiori da utilizzare per la costituzione varietale. Un importante carattere preso in considerazione è stato quello produttivo. In patata la produzione di tuberi è influenzata dall'elevata eterozigosità e l'uso delle specie selvatiche potrebbe non solo apportare miglioramenti per qualità e per resistenze a stress biotici e abiotici, ma anche determinare incrementi produttivi dovuti all'apporto di diversità allelica e quindi all'effetto eterotico. Nelle progenie NC abbiamo riscontrato un incremento medio produttivo, rispetto ai controlli coltivati, in molte famiglie. Inoltre, in ogni famiglia sono stati identificati cloni più produttivi rispetto al parentale 4x usato negli incroci $4x \times 2x$. Tali incrementi sono dovuti sia alla presenza di genoma selvatico (25% del totale), sia all'impiego del polline 2n prodotto con meccanismi di restituzione del nucleo nella prima divisione meiotica (FDR). Infatti, come già evidenziato da Peloquin *et al.* (1999), un grosso vantaggio dell'uso del polline 2n-FDR deriva dalla trasmissione di elevate quote d'interazioni intra ed interlocus da parte del parentale diploide alla progenie tetraploide.

È stato dimostrato che con meccanismi di tipo FDR tutti i loci dal centromero al primo crossing over che sono eterozigoti nel parentale 2x sono eterozigoti anche nel gamete 2n, ed il 50% dei loci tra il primo ed il secondo crossing over eterozigoti nel parentale

saranno eterozigoti anche nel gamete $2n$ (Peloquin *et al.* 1999). Se non avviene il crossing over, allora il genotipo intatto del parentale diploide verrà incorporato in ciascun gamete $2n$. Con meccanismi di restituzione del nucleo in seconda divisione meiotica (SDR) la percentuale di eterozigosi trasmessa tramite i gameti $2n$ è notevolmente inferiore. Inoltre, con meccanismi FDR i gameti $2n$ che si formano sono simili geneticamente, ed assomigliano al clone parentale dal quale derivano. Al contrario, i meccanismi SDR producono una popolazione eterogenea di gameti altamente omozigoti.

I nostri risultati confermano la validità della poliploidizzazione sessuale unilaterale tramite polline $2n$ -FDR nel produrre cloni con performance produttive elevate. Altri autori hanno già positivamente applicato gli schemi di poliploidizzazione sessuale al fine di introdurre diversità allelica e geni utili da specie selvatiche. Carputo *et al.* (1994) confrontarono in termini produttivi le progenie derivanti da incroci $4x \times 4x$ con quelle derivanti da incroci $4x \times 2x$. All'interno dei due gruppi fu identificata notevole variabilità con la produzione media della progenie $4x \times 2x$ superiore rispetto a quella ottenuta dalla progenie $4x \times 4x$ indipendentemente dal calibro dei tuberi seme usati. Ortiz *et al.* (1994) hanno valutato le potenzialità della poliploidizzazione sessuale per la produzione di patata nei paesi in via di sviluppo. Le famiglie $4x \times 2x$ evidenziarono produzioni che variavano da 0,27 a 0,52 kg pt⁻¹, mentre le due famiglie $4x \times 4x$ utilizzate come controllo hanno mostrato performance produttive variabili da 0,23 e 0,25 kg pt⁻¹. Oltre ad un incremento delle

produzioni medie delle famiglie $4x \times 2x$, gli autori constatarono anche la trasmissione, dalle specie selvatiche usate, di alcuni caratteri positivi quali la resistenza a nematodi, peronospora, appassimento batterico e al virus Y.

Buso *et al.* (2002) hanno incrociato 4 cultivar tetraploidi di patata con 10 ibridi diploidi *S. tuberosum*-*S. phureja* ottenendo 40 famiglie. Nonostante gli ibridi diploidi fossero stati selezionati in nord America e quindi in condizioni di giorno lungo, le progenie $4x \times 2x$ hanno evidenziato in Sud America un incremento medio della produzione del 12% rispetto alle cultivar di controllo locali. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche altre specie quali erba medica (Barcaccia *et al.* 1998) e *Lilium* (Barba-Gonzalez *et al.* 2004). Buso *et al.* (2002) riportarono che l'alto rendimento delle famiglie $4x \times 2x$ è spiegato da tre fattori importanti: (1) più elevata diversità genetica mediante l'acquisizione di nuovi alleli o di differenti combinazioni degli alleli dagli ibridi $2x$; (2) trasmissione alla progenie $4x$, mediante i gameti $2n$ FRD, della maggior parte o di tutte le interazioni alleliche presenti nell'ibrido diploide; (3) produzione di nuove interazioni di alto ordine nella progenie $4x$.

L'importanza dei gameti $2n$ FRD era già stata rilevata nel 1999 quando Buso *et al.* (1999b) condussero un lavoro sull'utilizzo dei gameti $2n$ finalizzato al confronto dei gameti $2n$ di tipo FDR-CO e FDR-NCO (rispettivamente derivanti e non da fenomeni di crossing over). Nonostante la teoria preveda differenze fra le due tipologie di gameti nella possibilità di trasmettere l'eterozigosità parentale (fino al 100% della nel caso dei gameti FDR-NCO e massimo 80% per i

gameti FDR-CO), in detto lavoro non sono state riscontrate differenze nell'impiego dei due tipi di gameti. Le motivazioni della discordanza fra le previsioni teoriche e i risultati ottenuti vanno probabilmente ricercate nelle conseguenze del piramidaggio genico. Infatti per ottenere gameti FDR-NCO è necessario incorporare due alleli recessivi (“*ps*” e “*sy-3*”) in forma omozigote, ovviamente con maggiori possibilità di depressione da inbreeding, rispetto all'incorporazione di un solo allele. I risultati ottenuti sono di fondamentale importanza per i programmi di breeding in quanto semplificano il lavoro di miglioramento genetico.

Diversamente da quanto atteso, nonostante presentassero 2 genomi di *S. commersonii* e 3 di *S. tuberosum*, gli ibridi MCPH non hanno ottenuto produzioni molto elevate e comunque nessuno ha superato le rese produttive della cultivar (Spunta) di controllo. Le ragioni per il mancato effetto eterotico vanno probabilmente ricercate nella presenza del genoma di *S. commersonii*. Tale specie, infatti, stenta a tuberizzare nei climi mediterranei e quindi potrebbe essere poco adatta alle condizioni pedoclimatiche mediterranee.

L'assenza di una significativa interazione genotipo × ambiente evidenziata dagli ibridi MCPH nei due anni di prova potrebbe essere un supporto a questa ipotesi.

Esempi di discordanza fra risultati attesi e risultati ottenuti, a causa dell'interazione genotipo-ambiente, sono stati già riportati in letteratura. Bani-Aameur *et al.* (1991) riscontrarono una differente adattabilità degli ibridi *S. tuberosum*-*S. phureja*-*S. chacoense* e degli ibridi *S. tuberosum*-*S. phureja* nell'area mediterranea in due differenti

stagioni. In condizioni di giorno e temperatura crescente gli ibridi *S. tuberosum*-*S. phureja* risultarono più produttivi del 162% e del 125% rispetto ai controlli *S. tuberosum* e agli ibridi in comparazione *S. tuberosum*-*S. phureja*-*S. chacoense*. In autunno, viceversa, gli ibridi *S. tuberosum*-*S. phureja*-*S. chacoense* risultarono i più produttivi con una produzione del 270% e il 170% superiore rispettivamente ai controlli *S. tuberosum* e agli ibridi *S. tuberosum*-*S. phureja*. Questi risultati sono concordi con quelli successivamente ottenuti da Buso *et al.* (1999d) i quali valutarono l'adattabilità di *S. chacoense* nelle condizioni di giorno lungo. Tale specie fu incrociata con parentali 4x precedentemente scelti per la loro adattabilità alle condizioni pedoclimatiche di differenti aree geografiche (Europa, Sud America e Nord America). La progenie 4x × 2x derivante mostrò una produzione media del 10,6% superiore rispetto ai parentali tetraploidi.

Ottimi risultati mediante poliploidizzazione sessuale fra specie coltivate e specie selvatiche sono stati ottenuti anche in termini di trasmissione di resistenze. Villamon *et al.* (2005), durante i loro programmi di miglioramento genetico, hanno testato ibridi *S. paucisectum*-*S. chomatophilum* per resistenza a *P. infestans*. Gli autori hanno individuato in *S. paucisectum* un'importante fonte di resistenza al predetto oomicete. I genotipi più interessatati sono poi stati utilizzati nei programmi di breeding al fine di inserire il carattere di resistenza nelle varietà coltivate. Carputo *et al.* (2000) durante la caratterizzazione di una progenie tetraploide *S. tuberosum*-*S. tarijense* ottenute mediante incroci 2x × 4x identificarono genotipi resistenti al batterio *Erwinia carotovora*. Nei medesimi ibridi furono riscontrati

anche ibridi con un peso specifico superiore rispetto al parentale *S. tuberosum* utilizzato come controllo. Anche Ortiz *et al.* (1997) mediante la poliploidizzazione sessuale $4x \times 2x$ sono riusciti a costituire ibridi tetraploidi *S. tuberosum*-*S. vernei*-*S. sparsipilum* resistenti a ceppi del nematode *Globodera pallida*.

L'incremento della produzione ed il trasferimento delle resistenze non sono gli unici obiettivi possibili mediante la poliploidizzazione sessuale. Culley *et al.* (2002), mediante uno schema che prevede sia ploidie ponte che raddoppiamento cromosomico *in vitro*, sono riusciti a migliorare la qualità del *gene pool* coltivato di patata utilizzando la specie selvatica *S. hjertingii*. Il carattere migliorato è la resistenza all'imbrunimento della polpa dovuto ad impatto. Questo problema è dovuto alla distruzione meccanica dei tessuti con conseguenti reazioni biochimiche catalizzate dalla polifenol-ossidasi. Gli autori hanno trovato una riduzione dell'imbrunimento potenziale nella progenie derivante da *S. hjertingii* il quale presenta una bassa attività di tale enzima. Analogamente Hayes e Thill (2002) mediante schemi di poliploidizzazione sessuale hanno costituito ibridi che inglobavano il genoma di più specie selvatiche (*S. tarijense*, *S. phureja*, *S. tuberosum* subsp *andigena*). E che sono adatti alla produzione di "chips".

Oltre che per il carattere produzione, i cloni delle famiglie NC e MCPH sono stati valutati anche per numerosi caratteri morfologici dei tuberi e per caratteri qualitativi. Infatti l'incremento delle rese produttive non deve essere l'unico obiettivo del miglioramento genetico. Dal dopoguerra ad oggi, sempre maggiore importanza viene

attribuita alla qualità dei nostri cibi. Per quanto riguarda la patata, la qualità può essere intesa sia in termini di aspetto del tubero, sia di composizione chimica. Nel primo caso una forma del tubero liscia ed uniforme, con occhi superficiali consente di massimizzare l'utilizzo del tubero (sia durante la trasformazione industriale che durante la preparazione in cucina). Nel secondo caso, invece, una qualità superiore determina migliori caratteristiche nutrizionali ed organolettiche e consente inoltre di migliorare i processi industriali, come nel caso dell'estrazione di amido.

I tuberi di patata non contengono una quantità elevata di vitamina C, se confrontati con vegetali quali pomodori e agrumi. Tuttavia essi rappresentano la maggiore fonte di tale molecola a causa del notevole consumo di tuberi. Il consumo di vitamina C quotidianamente raccomandato è stato incrementato da 60 a 90 mg/giorno (Levine *et al.* 2001). Gli ibridi NC hanno mostrato un contenuto di vitamina C mediamente superiore a quello presente nei parentali coltivati usati negli incroci 4x × 2x. Un incremento medio nella progenie da *S. phureja* era atteso in quanto in letteratura è riportato un contenuto di vitamina C nei tuberi di *S. phureja* statisticamente superiore a quello di altre specie tuberizzanti del genere *Solanum* (Davies *et al.* 2002). Per quanto riguarda invece gli ibridi MCPH, Esposito *et al.* (2002) indicarono un contenuto medio di vitamina C di *S. commersonii* leggermente inferiore a *S. tuberosum*. Tali dati, quindi, non lasciavo prevedere un miglioramento per questo parametro degli ibridi MCPH. I nostri dati indicano infatti un non

elevato di vitamina C negli ibridi BC₁ *S. commersonii*-*S. tuberosum*.

Data l'importanza di questa molecola nelle produzioni vegetali, sono stati approfonditi alcuni aspetti legati al contenuto di vitamina C in pianta. I risultati indicano che i cambiamenti nella biosintesi dell'AsA nelle foglie "source" hanno un rapido effetto nel contenuto di vitamina C, con conseguente incremento del trasporto di tale molecola negli organi di accumulo. Ciò è stato dedotto dagli esperimenti in cui precursori esogeni della vitamina C come L-GalL sono stati forniti alle foglie "source". È stato possibile incrementare in misura maggiore del 100% il contenuto vitamina C nelle foglie "source" di tutte le piante. Questo trattamento ha determinato aumenti significativi di vitamina C negli organi "sink" quali i fiori ed i tuberi in sviluppo. A nostra conoscenza questa è la prima dimostrazione che l'accumulo di vitamina C nelle foglie determina un aumento dello stesso negli organi di immagazzinamento ed è una possibile spiegazione dell'effetto positivo che ha la luce sul contenuto di vitamina C nella frutta e nelle verdure (Lee e Kader 2000). Hancock *et al.* (2003) hanno ipotizzato che il floema contiene l'intero complesso enzimatico per la biosintesi dell'AsA. I nostri risultati suggeriscono che il trasferimento indiretto di vitamina C dal mesofillo al floema potrebbe coinvolgere il trasporto del L-GalL, intermedio incapace di attraversare le membrane. Infatti L-GalL esogeno fornito alle foglie "source" determina un arricchimento dell'AsA negli organi di accumulo quali fiori, stoloni tuberizzanti e tuberi in sviluppo. In accordo con quanto già precedentemente riportati in *Arabidopsis*

thaliana e in *Medicago sativa* (Franceschi e Tarlyn 2002) è possibile ipotizzare un trasporto di lunga distanza di vitamina C anche in patata. Ipotizziamo quindi che un trasporto di acido ascorbico fra organi di produzione e organi di accumulo possa essere presente in tutte le piante. Sono in corso studi analoghi per valutare il trasporto e l'accumulo della vitamina C anche nei cloni NC ed MCPH.

Altro parametro qualitativo preso in considerazione è stato il peso specifico, di fondamentale importanza nel caso della destinazione industriale dei tuberi. Un peso specifico minimo di 1,080 infatti è indispensabile per ridurre i tempi di frittura e i consumi d'olio, con un conseguente notevole risparmio per l'industria di trasformazione. La progenie derivante dagli incroci con *S. phureja* ha presentato un peso specifico superiore rispetto al controllo *S. tuberosum* (cv Spunta). Tale risultato è in concordanza con quanto riscontrato da Tai e Jong (1997) durante la caratterizzazione di progenie $4x \times 2x$ e $4x \times 4x$, laddove il parentale maschile era un ibrido diploide *S. tuberosum*-*S. phureja* produttore di gameti $2n$ (nel caso degli incroci $4x \times 2x$) o con corredo cromosomico raddoppiato in vitro (nel caso degli incroci $4x \times 4x$). Gli autori identificarono nel loro lavoro un effetto positivo, in termini di peso specifico, del genoma *S. phureja*, ma soprattutto della strategia di poliploidizzazione sessuale.

Anche gli ibridi MCPH hanno mostrato un elevato valore di peso specifico. Gli alti valori di peso specifico per entrambi i gruppi di ibridi era ampiamente atteso in quanto sia *S. phureja* che *S. commersonii* presentano, fra le proprie caratteristiche positive, un elevato contenuto di sostanza secca nei tuberi.

Molta variabilità è stata riscontrata per i caratteri morfologici dei tuberi. In particolare, in termini di forma del tubero e specialmente per quanto riguarda gli ibridi MCPH, le progenie hanno prodotto tuberi con forme spesso irregolari. È stata confermata la tendenza dei caratteri stoloni lunghi (dati non mostrati) e occhi profondi, tipici delle specie selvatiche, ad essere trasmessi alla progenie. Altro carattere che ha fatto riscontrare molta variabilità è stato la precocità. Esso rappresenta un importante aspetto della pataticoltura moderna, dove le produzioni extrastagionali sono molto remunerative.

Oltre che per le produzioni, anche per la lunghezza del ciclo biologico è stata riscontrata differenza fra gli ibridi NC ed ibridi MCPH. In particolare, nel primo gruppo è stata individuata una ampia variabilità con numerosi ibridi che hanno presentato un ciclo biologico inferiore alle cultivar di controllo, cosa che non è accaduta per gli ibridi MCPH. Questo dato era in una certa misura atteso in quanto *S. phureja* (parentale degli ibridi NC) è una specie coltivata in sud America e quindi selezionata per un ciclo biologico breve, cosa che non è avvenuta per *S. commersonii* (parentale degli MCPH). Da ricordare che un ciclo vegetativo inferiore ai 120 giorni è fra i più importanti parametri di selezione per una nuova cultivar. Inoltre, un ciclo breve è di particolare importanza se si mira a costituire cultivar adatte alla coltivazione extrastagionale, la quale fornisce un raccolto molto remunerativo a causa della scarsità di prodotto fresco reperibile sul mercato europeo nei periodi autunnali e primaverili.

Le cultivar di patata europee hanno origine da poche specie inizialmente introdotte in Europa; probabilmente nel corso degli anni

sono state introdotte altre specie con un ampliamento della variabilità coltivata (Ross 1986). Tuttavia è da ricordare che, a causa di una epidemia di peronospora (agente causante l'oomicete *Phytophthora infestans*) avvenuta nel 1840, molte cultivar di patata furono distrutte con una conseguente notevole perdita di variabilità genetica. I danni subiti da tale epidemia non furono solo la perdita di biodiversità, ma soprattutto il mancato soddisfacimento del fabbisogno alimentare per milioni di persone. Ancora oggi *P. infestans*, insieme a numerosi altri patogeni, determina grossi problemi per la pataticoltura nelle aree temperate (Gebhardt e Valkonen 2001).

Per evitare l'uso massiccio di fitofarmaci e perdite ingenti di prodotto è importante agire in due direzioni: evitare l'introduzione di nuove patologie e costituire nuove cultivar di patata con il più elevato numero possibile di resistenze ad agenti biotici ed abiotici. Il miglioramento genetico ha già da molto tempo intrapreso la strada dell'introgressione da specie selvatiche di geni di resistenza nel genoma coltivato. Fra i lavori più recenti vanno ricordati lo studio di Costanzo *et al.* (2005), finalizzato ad identificare QTL per resistenza al patogeno *P. infestans* nel genoma di patata. In detto lavoro gli autori, mediante l'analisi della progenie derivante dall'incrocio di *S. phureja* con *S. stenototum*, hanno identificato 3 principali QTL sui cromosomi III, V e XI, rispettivamente con il 23,4, 17,9 e 9,4 % della variabilità fenotipica.

Altro lavoro interessante è stato svolto da Janssen *et al.* (1997). Durante la loro attività di miglioramento genetico della patata basato sull'uso delle specie selvatiche, gli autori trasferirono mediante

ibridazione sessuale il carattere di resistenza ai nematodi *Meloidogyne chitwoodi* e *Meloidogyne fallax* dalle specie selvatiche *S. stoloniferum*, *S. fendleri* e *S. hougasii* in ibridi BC₁ di patata. Alcune combinazioni d'incrocio coinvolgenti *S. fendleri* generarono popolazioni totalmente resistenti ai predetti nematodi. Gli autori giustificarono tale dato con la probabile presenza di tutto il genoma del parentale selvatico nella progenie BC₁, a causa della presenza dei gameti 2n prodotti da *S. fendleri*. L'uso delle specie selvatiche è risultato utile anche per il trasferimento della resistenza ai virus PVY, PVA e PVX dalla specie selvatica *S. brevidens* a *S. tuberosum* (Valkonen *et al.* 1998). Per trasferire il carattere d'interesse, data la incompatibilità sessuale fra le due specie, gli autori utilizzarono la fusione somatica.

In questa tesi il lavoro è stato finalizzato alla valutazione della resistenza a due importanti batteri: *Erwinia carotovora* e *Ralstonia solanacearum*. Il fitopatogeno *E. carotovora* presenta una classificazione tassonomica molto complessa che comprende cinque sottospecie differenziate in funzione fenotipica, biochimica, delle piante ospiti e delle caratteristiche genetiche. È un batterio Gram-negativo, non sporigeno, anaerobico facoltativo ed esplica la sua funzione fitopatogena con la secrezione extracellulare di un pool di enzimi molto più vasto se confronto con altri batteri saprofiti. Questi enzimi comprendono pectinasi, cellulasi e xylanasi con differenti proprietà (Collmer e Keen 1986). Le pectinasi sono i più importanti esoenzimi coinvolti nella malattia. Esse distruggono ed utilizzano le pectine della lamella mediana della parete cellulare causando conseguentemente il

collasso dei tessuti e la morte cellulare (Pérombelon 2002). Due delle cinque sottospecie (*E. carotovora* ssp. *carotovora* ed *E. carotovora* ssp. *atroseptica*) sono le cause principali delle malattie note come marciume della parte aerea, gamba nera e marciume molle dei tuberi di patata, ritenute fra quelle economicamente più devastanti per la patata (Pérombelon 2002).

Il marciume molle dei tuberi trova ampia facilità di diffusione nelle nostre aree a causa della scarsità di cultivar resistenti (Yi *et al.* 2004). La bassa efficienza del miglioramento genetico in questo settore è probabilmente dovuta al fatto che la resistenza a tale batterio è associata a geni localizzati su numerosi cromosomi (Zimnoch-Guzowska *et al.* 2000). Il controllo di questa malattia è reso difficile, oltre che dall'assenza di fitofarmaci efficaci contro i batteri, anche dal vasto numero di piante ospiti, dall'ampio range di temperature a cui il batterio cresce e dalla possibilità di infezione latente nei tuberi dove il batterio si localizza nei fasci xilematici, nelle ferite e nelle lenticelle suberizzate (Pérombelon 2002). Altra difficoltà per il controllo di questo batterio è la capacità di sopravvivere per molti mesi anche in assenza di pianta ospite (Pérombelon 1992).

Zimnoch-Guzowska *et al.* (2000) hanno studiato l'ereditabilità della resistenza al marciume molle nelle famiglie diploidi di patata ed hanno identificato correlazioni con 12 QTL posizionati su 10 cromosomi. Un QTL sul cromosoma I è stato ritenuto quello con più ampio effetto (19% di variabilità fenotipica). Il controllo quantitativo della resistenza fa incrementare notevolmente il grado di difficoltà per il suo trasferimento nel *gene pool* coltivato. Nonostante i numerosi

studi e gli interessanti risultati ottenuti in merito, dal punto di vista del miglioramento genetico della patata non è stata ancora costituita una cultivar di patata completamente resistente (o tollerante) a tale malattia (Tek *et al.* 2004). Recentemente Lebecka *et al.* (2004) hanno ottenuto interessanti risultati tramite poliploidizzazione sessuale unilaterale basata sull'uso di ibridi con genoma costituito da tutte o alcune delle seguenti specie selvatiche *S. tuberosum*, *S. chacoense*, *S. yungasense*, *S. phureja*, *S. gourlayi* ed infine *S. demissum*. Incrociando detti ibridi con 8 cultivar tetraploidi suscettibili, gli autori hanno ottenuto 24 famiglie. Dall'analisi della progenie ottenuta, è stata identificata una percentuale variabile dallo 0% al 80% di cloni resistenti in ogni famiglia. Gli autori hanno trovato una correlazione significativa fra la resistenza al marciume molle e sia il carattere stoloni lunghi che la forma irregolare dei tuberi. Lo screening effettuato sul materiale vegetale oggetto di studio di questa tesi ha indicato numerosi ibridi, appartenenti ad entrambi i gruppi, che hanno presentato elevati livelli di resistenza. Nello specifico, il 17% degli ibridi NC ed il 19% degli ibridi MCPH hanno mostrato un diametro della lesione, dopo inoculo artificiale con il batterio, inferiore a 4 mm. La permanenza di alcuni caratteri indesiderati derivanti dall'uso di specie selvatiche suggerisce l'uso di questi cloni come parentali per futuri reincroci al fine di trasferire i caratteri positivi introdotti dalle specie selvatiche.

R. solanacearum è l'agente dell'appassimento batterico ed è considerato uno dei più devastanti batteri fitopatogeni in termini di perdite economiche in tutto il mondo (Hayward 1991). Nelle

condizioni maggiormente favorevoli al batterio stesso, si possono registrare perdite fino al 100% della produzione (Berrocal-Lobo *et al.* 2002). Il batterio, inoltre, presenta un ampio numero di specie vegetali ospiti suscettibili (oltre 50 famiglie; Hayward 2000). Il range include non solo solanacee (pomodoro, patata, melanzana e tabacco), ma anche leguminose (fagiolini), monocotiledoni (banano e zenzero), diversi alberi e arbusti (olivo, eucalipto) ed erbacee (*Arabidopsis thaliana*) (Deslandes *et al.* 1998). *R. solanacearum* invade le piante attraverso le ferite della radice o ai siti di formazione delle radici secondarie. Dopo l'invasione, sono colonizzati sia gli spazi intercellulari della corteccia che il parenchima vascolare della radice; quindi le pareti delle cellule si rompono, facilitando così la diffusione attraverso il sistema vascolare (Vasse *et al.* 1995). Alcune specie selvatiche resistenti o altamente tolleranti a *R. solanacearum* sono state usate come potenziali fonti di resistenza. Sfortunatamente ibridi sessuali di patata con genotipi resistenti di *S. chacoense*, *S. sparsipillum* e *S. multidissectum* hanno rivelato un moderato livello di resistenza all'avvizzimento batterico. Recentemente la resistenza all'avvizzimento batterico è stata riscontrata in *S. commersonii* e sono iniziati tentativi di trasferire la resistenza attraverso ibridazione somatica (Laferriere *et al.* 1999; Kim-Lee *et al.* 2005). Nessun tentativo è stato fin'ora fatto per trasmettere il carattere mediante ibridazione sessuale. I nostri risultati sono quindi i primi a dimostrare la possibilità di trasmettere per via sessuale questa resistenza dalla specie selvatica *S. commersonii* al *gene pool* coltivato. Nonostante l'impiego effettuato in passato, è da sconsigliare l'uso di *S. phureja*

come fonte di resistenza a questo patogeno perché la specie presenta una resistenza temperatura-sensibile (Ciampi e Sequeira 1980; Tung 1992; French *et al.* 1998). La resistenza all'avvizzimento batterico è stata trovata anche in *S. stenotomum*, altra specie botanicamente molto vicina alla patata. Nonostante l'elevata efficienza registrata nel trasmettere i caratteri di resistenza all'avvizzimento batterico (più del 80% delle piante valutate non ha presentato sintomi; Martin 1979), questa specie è stata fin ora poco sfruttata dai miglioratori a causa dell'elevatissimo numero di caratteri sfavorevoli che trasmette alla progenie.

Mediante l'utilizzo di *S. commersonii* è stato possibile introgredire la resistenza a *R. solanacearum* nella progenie MCPH. Questa progenie è (aneuploide) pentaploide, ma nonostante il livello anomalo di ploidia è funzionalmente tetraploide con EBN=4, facilmente incrociabile con *S. tuberosum* (Carputo 2003). Essa sarà quindi una preziosa fonte per il miglioramento genetico da utilizzare mediante cicli di reincrocio. Ricordiamo che, nonostante tale patogeno sia oggi considerato un batterio da quarantena, sempre più frequenti sono le segnalazioni di ceppi ritrovati nelle aree europee (Caruso *et al.* 2005). I nostri risultati evidenziano chiaramente come, anche mediante ibridazione sessuale, sia possibile trasferire il carattere di resistenza (totale o parziale). Casi di “disease escape” oppure “falsi positivi”, dovuti a eccessive o insufficienti ferite all'apparato radicale, presenza di altri patogeni e stazionamento del batterio nel suolo senza penetrare nella pianta, sono probabilmente da escludere nei materiali

da noi studiati. Prove ripetute, infatti, hanno sempre confermato la resistenza/suscettibilità degli ibridi.

Kim-Lee *et al.* (2005) hanno costituito ibridi somatici *S. commersonii* (+) *S. tuberosum* e hanno analizzato la resistenza a *R. solanacearum* in due generazioni di reincrocio. Gli autori riportano che ad ogni passaggio generazionale e quindi con l'incremento della percentuale del genoma di *S. tuberosum*, c'è stato un incremento della suscettibilità media. In un campione di progenie BC₂ ottenuta da incroci MCPH × *S. tuberosum*, abbiamo identificato diversi cloni resistenti all'avvizzimento batterico. Tale dato è di notevole importanza in quanto è la conferma che il carattere è oramai stabilmente inserito nel genoma *S. tuberosum* ed è utilizzabile nei programmi di miglioramento genetico per costituire nuove cultivar di patata resistenti a tale batterio. È inoltre da segnalare che i valori del grado di dominanza da noi ottenuti fanno ipotizzare che il fenotipo selvatico (resistente) sia dominante; ciò è importante in quanto facilita l'attività di miglioramento genetico

Tra i recenti sviluppi della biologia molecolare, i marcatori molecolari hanno assunto un ruolo determinante per l'acquisizione di conoscenze su meccanismi finora oscuri della genetica vegetale e del miglioramento vegetale. Essi, infatti, consentono di studiare la variabilità genetica direttamente a livello del DNA, superando le difficoltà dell'analisi della variabilità fenotipica dovute all'effetto ambientale. Pertanto, sono stati utilizzati in molte specie vegetali, sia per valutare e caratterizzare la variabilità genetica tra i genotipi vegetali di interesse, che per costruire mappe genetiche in piante

superiori, per monitorare l'introgressione di geni utili da specie selvatiche a quelle coltivate, nonché per operare una selezione assistita per caratteri di interesse. L'attività di miglioramento genetico può avvantaggiarsi dall'uso di marcatori molecolari, specialmente quando sono disponibili marcatori specifici per un determinato carattere d'interesse. In loro assenza i marcatori molecolari, associati ad una approfondita analisi fenotipica, possono facilitare la selezione negativa individuando gli ibridi con il maggior contenuto di bande specifiche della specie selvatica e il maggior numero di caratteristiche positive. I marcatori AFLP sono stati scelti perché permettono di individuare un elevato numero di bande *S. commersonii* specifiche (Iovene *et al.* 2004).

Nella presente tesi bande AFLP *S. commersonii* specifiche sono state utilizzate per discriminare gli ibridi MCPH con un'elevata percentuale delle predette bande. Gli ibridi identificati sono stati scartati perché ritenuti essere quelli con la maggiore possibilità di mostrare caratteri negativi. I risultati pubblicati da Carputo *et al.* (2003) sembrano essere confortanti in questo senso. Infatti, ibridi *S. commersonii*-*S. tuberosum* con una ridotta percentuale di marcatori AFLP *S. commersonii* specifici hanno mostrato un buon contenuto in commersonina, tomatina e demissina, glicoalcaloidi tipici di *S. commersonii*.

Per la selezione degli ibridi MCPH sono stati seguiti due strategie differenti, ossia l'analisi delle componenti principali e l'indice di valutazione associato alla percentuale di bande *S. commersonii* specifiche. Le due strategie hanno determinato la

selezione di due differenti gruppi di ibridi MCPH da selezionare. Questa discordanza è dovuta ad un maggiore peso che è stato attribuito ad alcuni parametri durante la determinazione dell'indice di valutazione. Utilizzato per la selezione assistita da marcatori AFLP. Il numero notevolmente limitato di caratteri analizzati rende ancora precoce un confronto tra le due differenti strategie. Ulteriori indagini, pertanto potranno essere condotte per uno studio più approfondito. Tuttavia, data l'elevata ereditabilità dei caratteri provenienti da *S. commersonii*, per proseguire il lavoro di miglioramento genetico avviato con questa tesi, gli ibridi utilizzati nei reincroci sono stati quelli con la più bassa percentuale di marcatori AFLP *S. commersonii* specifici e più alto indice di valutazione.

7. Conclusioni

In questa tesi sono state studiate le progenie derivanti da due differenti schemi di ingegneria genomica messi a punto per l'introggressione di variabilità allelica e geni utili delle specie selvatiche 2x(2EBN) *S. phureja* e 2x(1EBN) *S. commersonii*. Lo studio ha riguardato la valutazione delle potenzialità produttive e della resistenza a stress biotici. L'uso delle specie selvatiche tuberizzanti del genere *Solanum* nei programmi di miglioramento genetico ha consentito di recuperare caratteri qualitativi interessanti come elevato peso specifico, elevato contenuto in vitamina C e resistenze a stress biotici.

Differenze in termini produttivi sono state riscontrate per entrambi i gruppi di materiali. I cloni NC, ottenuti da incroci $4x \times 2x$, sono risultati più produttivi delle varietà controllo, confermando quindi la validità della poliploidizzazione sessuale unilaterale 2n-FDR. Diversamente da quanto atteso, gli ibridi MCPH, provenienti da incroci $3x \times 4x$, non hanno dato produzioni elevate e comunque nessuno ha superato le rese produttive del controllo Spunta. Le ragioni per il mancato effetto eterotico vanno probabilmente ricercate nella presenza del genoma di *S. commersonii*. Tale specie, infatti, stenta a tuberizzare nei climi mediterranei e quindi potrebbe essere poca adatta alle condizioni pedoclimatiche in cui sono state effettuate le prove sperimentali. Valutazioni future potrebbero essere finalizzate a caratterizzare la produzione in ciclo bisestile, con semina ad agosto e raccolta a dicembre.

In queste condizioni climatiche (luce e temperatura

decadenti), infatti, gli ibridi MCPH potrebbero trovare un maggiore adattamento.

Gli ibridi NC e MCPH sono stati valutati che per numerosi caratteri qualitativi (peso specifico dei tuberi, contenuto in vitamina C, caratteristiche morfologiche dei tuberi). È emersa una notevole variabilità nell'ambito della quale il lavoro di miglioramento genetico potrebbe portare alla selezione di genotipi interessanti. Particolarmente promettenti sono i risultati relativi alla resistenza ad *Erwinia carotovora* e *Ralstonia solanacearum*. Sono stati infatti identificati ibridi che associavano buone caratteristiche dei tuberi a resistenze a queste batteriosi, ritenute fra le più pericolose per la coltivazione delle patate. Nonostante l'elevato E.I., particolarmente interessante è risultato un ibrido *S. tuberosum*-*S. commersonii* (MCPH 21) che annovera la resistenza ad entrambe le batteriosi. Questo ibrido è stato comunque mantenuto nel gruppo dei potenziali parentali e quindi la pressione selettiva esercitata in questo caso non è stata molto forte.

Dall'analisi delle progenie NC e MCPH è stata identificata una percentuale variabile di cloni con caratteristiche interessanti. Tuttavia, come spesso accade nei programmi d'ibridazione interspecifica, è stata confermata la presenza di "linkage drag" dovuta all'associazione genetica tra i geni utili e geni che controllano caratteri indesiderati quali stoloni lunghi e forma irregolare dei tuberi. La permanenza di caratteri indesiderati derivanti dall'uso di specie selvatiche suggerisce l'uso di alcuni cloni particolarmente interessanti come parentali per futuri reincroci.

Nell'ambito di questo lavoro è stata anche utilizzata una strategia di selezione assistita mediante marcatori molecolari AFLP e determinazione di un indice di valutazione. Tale strategia applicata sui cloni MCPH ha consentito la selezione dei cloni con un basso contenuto di bande AFLP specifiche di *S. commersonii* ed un elevato indice di valutazione. Questi cloni hanno un'elevata potenzialità a combinare caratteri positivi con un basso contenuto di genoma selvatico e quindi un ridotto "linkage drag". Riteniamo che questa strategia di selezione potrebbe essere utilizzata in tutti i programmi di ibridazione interspecifica che non possono avvalersi di marcatori molecolari associati ai caratteri d'interesse. Le caratteristiche dei cloni MCPH e NC selezionati alla fine di questo lavoro sono riportati in appendice 3 e 4. questi cloni sono già stati utilizzati nell'estate 2005 in reincroci con *S. tuberosum*

Allegato 1 - Dati produttivi medi dei cloni NC *Solanum tuberosum* - *Solanum phureja* allevati a Camigliatello Silano nel 2002 e 2003

Genotipo	2002		2003	
	Produzione (kg pt ⁻¹)	N° tuberi	Produzione(kg pt ⁻¹)	N° tuberi
Atzimba	0,18 ± 0,02	3,5 ± 1,6	0,23 ± 0,07	3,7 ± 0,0
Carmine	0,82 ± 0,12	8,7 ± 3,3	0,24 ± 0,22	2,7 ± 2,4
LC0091	0,81 ± 0,08	10,2 ± 3,1	0,47 ± 0,09	6,0 ± 0,0
MC330	0,23 ± 0,04	4,3 ± 0,5	0,13 ± 0,06	2,8 ± 1,2
S 86 - 24	0,65 ± 0,07	7,8 ± 1,1	0,65 ± 0,07	7,9 ± 0,1
Serrana	0,54 ± 0,01	6,9 ± 0,6	0,27 ± 0,11	4,6 ± 0,7
UP88-P5	0,11 ± 0,06	5,7 ± 2,8	0,03 ± 0,02	3,5 ± 1,6
I	0,17 ± 0,05	4,7 ± 0,5	0,08 ± 0,02	2,3 ± 1,4
NC 5 - 1	0,47 ± 0,07	7,7 ± 0,2	0,88	18,0
NC 5 - 2	0,25 ± 0,07	4,3 ± 0,5	0,43 ± 0,28	6,7 ± 1,9
NC 5 - 3	0,60 ± 0,14	4,3 ± 0,5	0,29 ± 0,06	4,4 ± 1,3
NC 5 - 4	0,87 ± 0,10	4,7 ± 0,1	1,01 ± 0,34	16,0 ± 4,2
NC 5 - 5	0,43 ± 0,04	3,0 ± 0,4	0,77 ± 0,09	11,2 ± 2,6
NC 5 - 6	0,80 ± 0,07	8,0 ± 0,3	0,82 ± 0,31	11,2 ± 0,7
NC 5 - 7	0,58 ± 0,11	7,7 ± 0,1	0,13 ± 0,09	4,2 ± 3,5
NC 5 - 8	0,52 ± 0,03	3,7 ± 0,1	1,30 ± 0,05	9,8 ± 3,5
NC 5 - 9	0,57 ± 0,03	5,7 ± 0,0	0,26 ± 0,11	5,7 ± 1,4
NC 5 - 10	0,70 ± 0,07	10,0 ± 0,4	0,05 ± 0,02	2,2 ± 1,6
NC 5 - 12	0,43 ± 0,04	3,0 ± 0,4	0,57 ± 0,09	8,2 ± 1,2
NC 5 - 13	0,28 ± 0,04	2,3 ± 0,5	0,21 ± 0,08	5,0 ± 1,4
NC 5 - 14	0,70 ± 0,06	6,0 ± 0,6	0,73 ± 0,09	11,2 ± 3,5
NC 5 - 15	0,97 ± 0,04	6,3 ± 0,5	0,66 ± 0,08	6,5 ± 1,2
NC 10 - 1	0,71 ± 0,41	10,2 ± 8,2	0,48 ± 0,22	7,0 ± 0,5
NC 10 - 2	0,26 ± 0,22	3,3 ± 1,9	0,43 ± 0,02	7,0 ± 1,4
NC 10 - 3	0,50 ± 0,05	6,3 ± 0,5	0,33 ± 0,12	8,3 ± 0,5
NC 10 - 4	0,58 ± 0,32	7,7 ± 0,5	0,47 ± 0,09	9,5 ± 1,2
NC 10 - 5	0,46 ± 0,01	8,0 ± 5,2	1,08 ± 0,16	22,8 ± 1,2
NC 10 - 6	0,50 ± 0,07	4,7 ± 0,1	0,33 ± 0,15	5,5 ± 2,1
NC 10 - 7	0,21 ± 0,04	2,7 ± 0,5	0,43 ± 0,24	7,7 ± 3,3
NC 10 - 8	0,60 ± 0,07	5,0 ± 0,7	1,10 ± 0,14	13,3 ± 1,4
NC 10 - 9	0,13 ± 0,15	1,8 ± 1,6	0,50 ± 0,19	9,2 ± 1,6
NC 10 - 10	0,45 ± 0,40	13,0 ± 11,8	0,48 ± 0,11	11,8 ± 0,2
NC 10 - 11	0,96 ± 0,46	12,7 ± 9,4	0,68 ± 0,70	14,8 ± 16,3
NC 10 - 13	0,71 ± 0,01	10,2 ± 3,5	0,34 ± 0,34	5,0 ± 3,8
NC 10 - 14	0,53 ± 0,53	6,8 ± 1,2	0,16 ± 0,08	4,5 ± 1,2
NC 10 - 15	0,28 ± 0,19	5,8 ± 4,9	0,91 ± 0,29	15,0 ± 3,8
NC 10 - 16	0,29 ± 0,29	3,8 ± 3,1	0,67 ± 0,38	5,8 ± 1,2
NC 10 - 17	0,55 ± 0,07	8,0 ± 0,7	0,59 ± 0,08	11,3 ± 2,4
NC 10 - 18	0,32 ± 0,05	5,5 ± 0,7	0,82 ± 0,16	10,7 ± 2,8
NC 12 - 2	0,26 ± 0,31	3,5 ± 4,0	0,53 ± 0,02	7,2 ± 0,2
NC 12 - 3	0,28 ± 0,09	2,8 ± 0,7	0,15 ± 0,12	4,2 ± 0,7
NC 12 - 4	0,58 ± 0,03	9,2 ± 0,2	0,45 ± 0,09	8,3 ± 0,5
NC 12 - 5	0,05 ± 0,03	0,8 ± 0,2	0,19 ± 0,16	3,0 ± 2,8
NC 12 - 6	0,20 ± 0,07	2,3 ± 0,5	0,38 ± 0,02	6,0 ± 3,3
NC 12 - 7	0,19 ± 0,11	3,3 ± 2,4	0,15 ± 0,07	3,8 ± 1,2
NC 12 - 8	0,15 ± 0,00	2,5 ± 1,2	0,48 ± 0,02	5,6 ± 0,1
NC 12 - 9	0,06 ± 0,04	2,2 ± 1,2	0,41 ± 0,08	6,5 ± 0,7
NC 12 - 11	0,43 ± 0,04	4,2 ± 0,2	0,03 ± 0,01	2,6 ± 1,5
NC 12 - 13	0,30 ± 0,40	1,3 ± 0,9	0,06 ± 0,01	2,8 ± 0,7
NC 12 - 14	0,20 ± 0,14	3,0 ± 0,4	0,52 ± 0,31	4,7 ± 0,5

NC 12 - 15	0,11 ± 0,08	3,7 ± 1,9	0,13 ± 0,11	3,2 ± 2,1
NC 15 - 1	0,43 ± 0,03	7,3 ± 0,4	0,33 ± 0,13	5,7 ± 0,9
NC 15 - 2	0,13 ± 0,13	3,3 ± 0,5	0,31 ± 0,13	4,5 ± 0,7
NC 15 - 3	0,37 ± 0,03	10,0 ± 0,3	0,38 ± 0,07	8,0 ± 0,5
NC 15 - 4	0,23 ± 0,03	3,3 ± 0,5	0,75 ± 0,78	8,8 ± 0,7
NC 15 - 5	0,60 ± 0,19	5,7 ± 1,4	0,91 ± 1,07	7,8 ± 3,5
NC 15 - 6	0,73 ± 0,22	4,8 ± 0,7	1,10	9,3
NC 15 - 7	0,25 ± 0,26	4,8 ± 3,5	0,88 ± 0,40	13,2 ± 0,2
NC 15 - 8	0,26 ± 0,04	2,7 ± 0,0	1,12 ± 0,07	11,8 ± 2,1
NC 15 - 9	0,55 ± 0,21	5,0 ± 1,0	0,60 ± 0,19	8,3 ± 4,2
NC 15 - 10	0,27 ± 0,16	2,8 ± 0,2	0,86 ± 0,11	6,7 ± 0,9
NC 15 - 11	0,28 ± 0,03	2,7 ± 0,1	0,62 ± 0,21	7,2 ± 2,1
NC 15 - 12	0,73 ± 0,05	6,8 ± 3,5	0,90	10,3
NC 15 - 13	0,63 ± 0,04	6,3 ± 0,4	0,49 ± 0,04	7,5 ± 0,7
NC 15 - 15	0,60 ± 0,14	4,3 ± 0,4	0,58 ± 0,21	5,7 ± 3,8
NC 15 - 16	0,37 ± 0,10	2,6 ± 0,3	0,19 ± 0,15	4,3 ± 0,5
NC 15 - 17	0,90 ± 0,14	7,3 ± 0,5	0,07	2,7
NC 15 - 18	0,17 ± 0,03	2,7 ± 0,0	0,54 ± 0,08	10,7 ± 0,0
NC 18 - 1	0,14 ± 0,13	1,8 ± 1,6	0,58 ± 0,25	10,3 ± 2,4
NC 18 - 2	0,08 ± 0,02	1,8 ± 0,2	0,33 ± 0,15	5,0 ± 1,9
NC 18 - 3	0,52 ± 0,61	6,0 ± 6,6	0,63 ± 0,32	7,2 ± 4,9
NC 18 - 5	0,55 ± 0,07	6,3 ± 3,3	0,57 ± 0,24	7,5 ± 3,5
NC 18 - 6	0,56 ± 0,04	6,0 ± 1,9	0,01 ± 0,01	0,3 ± 0,5
NC 18 - 8	1,00 ± 0,14	10,0 ± 0,7	0,71 ± 0,18	10,0 ± 2,8
NC 18 - 9	0,26 ± 0,13	2,0 ± 0,9	0,28 ± 0,14	4,3 ± 0,5
NC 18 - 10	0,08 ± 0,02	1,5 ± 0,3	0,12 ± 0,06	5,2 ± 3,1
NC 18 - 11	0,23 ± 0,31	3,3 ± 3,8	0,48 ± 0,02	6,3 ± 1,4
NC 18 - 12	0,23 ± 0,04	3,7 ± 0,1	0,42 ± 0,12	6,7 ± 3,3
NC 21 - 1	0,19 ± 0,18	4,2 ± 1,2	0,61 ± 0,39	5,7 ± 2,8
NC 21 - 2	0,33 ± 0,19	5,0 ± 2,8	0,58 ± 0,35	7,0 ± 2,4
NC 21 - 3	0,45 ± 0,02	12,5 ± 3,5	0,40 ± 0,57	9,3 ± 13,2
NC 21 - 4	0,36 ± 0,22	4,8 ± 2,1	0,08 ± 0,02	3,5 ± 2,1
NC 21 - 5	0,25 ± 0,12	7,3 ± 4,2	0,80 ± 0,57	10,8 ± 4,5
NC 21 - 6	0,21 ± 0,13	5,7 ± 3,8	0,40 ± 0,19	7,8 ± 2,6
NC 21 - 7	0,37 ± 0,19	7,0 ± 1,9	0,09 ± 0,04	3,0 ± 0,9
NC 21 - 8	0,37 ± 0,38	8,2 ± 8,2	0,69 ± 0,04	9,2 ± 0,2
NC 21 - 9	0,21 ± 0,11	5,7 ± 2,4	0,54 ± 0,14	5,5 ± 0,2
NC 21 - 10	0,47 ± 0,04	4,7 ± 0,1	0,87 ± 0,14	7,8 ± 5,9
NC 21 - 11	0,13 ± 0,02	5,7 ± 0,0	0,02 ± 0,02	1,5 ± 2,1
NC 21 - 12	0,75 ± 0,07	6,0 ± 0,6	0,70 ± 0,73	10,3 ± 7,5
NC 21 - 13	0,44 ± 0,58	3,0 ± 2,4	0,30 ± 0,24	8,0 ± 8,5
NC 21 - 14	0,08 ± 0,11	2,2 ± 1,2	0,10 ± 0,14	3,3 ± 3,9
NC 21 - 15	0,74 ± 0,22	8,7 ± 0,0	1,67 ± 0,00	15,7 ± 0,0
NC 21 - 16	0,13 ± 0,19	3,5 ± 4,9	0,67 ± 0,21	8,8 ± 3,5
NC 21 - 18	0,13 ± 0,15	3,5 ± 3,1	0,65 ± 0,21	4,0 ± 4,8
NC 21 - 19	0,29 ± 0,11	5,5 ± 0,2	0,34 ± 0,20	6,8 ± 1,6
NC 23 - 1	0,39 ± 0,48	4,2 ± 4,0	0,58 ± 0,18	10,8 ± 8,1
NC 23 - 2	0,27 ± 0,04	4,0 ± 0,3	0,48 ± 0,24	9,5 ± 3,5
NC 23 - 3	0,27 ± 0,21	4,3 ± 0,0	0,30	6,3
NC 23 - 4	0,41 ± 0,27	8,2 ± 5,4	0,15 ± 0,12	3,7 ± 0,9
NC 23 - 5	0,30 ± 0,24	7,0 ± 3,8	0,27 ± 0,33	6,3 ± 6,6
NC 23 - 6	0,83 ± 0,09	7,7 ± 0,9	0,22 ± 0,09	4,9 ± 0,8
NC 23 - 7	0,37 ± 0,05	7,8 ± 1,6	0,25 ± 0,21	5,3 ± 3,8
NC 23 - 8	0,37 ± 0,19	6,3 ± 3,8	0,13 ± 0,14	3,7 ± 1,9
NC 23 - 9	0,23 ± 0,04	2,7 ± 0,1	0,35 ± 0,45	3,5 ± 4,0
NC 23 - 10	0,35 ± 0,09	3,8 ± 1,2	0,13 ± 0,00	4,5 ± 1,6
NC 23 - 11	0,40 ± 0,14	3,0 ± 0,7	0,48 ± 0,31	7,5 ± 2,6

NC 23 - 12	0,18 ± 0,08	3,3 ± 0,5	0,67 ± 0,19	8,3 ± 1,9
NC 25 - 1	0,08 ± 0,02	2,8 ± 1,2	0,38 ± 0,16	7,2 ± 4,5
NC 25 - 2	0,22 ± 0,28	3,7 ± 4,7	0,13 ± 0,05	2,7 ± 0,0
NC 25 - 3	0,12 ± 0,07	2,0 ± 0,5	0,58 ± 0,32	4,8 ± 1,2
NC 25 - 4	0,18 ± 0,01	3,7 ± 1,9	0,63 ± 0,00	9,0 ± 0,5
NC 25 - 5	0,13 ± 0,10	6,2 ± 3,5	0,30 ± 0,00	8,7 ± 3,8
NC 25 - 6	0,68 ± 0,02	7,7 ± 3,8	0,53 ± 0,08	12,2 ± 5,9
NC 25 - 7	0,18 ± 0,09	5,8 ± 2,1	0,28 ± 0,32	5,5 ± 3,1
NC 25 - 8	0,55 ± 0,31	7,8 ± 0,7	0,22 ± 0,21	6,7 ± 6,1
NC 25 - 9	0,03 ± 0,01	2,6 ± 0,1	0,38 ± 0,07	5,8 ± 2,6
NC 25 - 10	0,39 ± 0,39	5,2 ± 3,5	0,07 ± 0,09	2,7 ± 3,8
NC 25 - 11	0,29 ± 0,29	7,7 ± 3,3	0,40 ± 0,19	11,0 ± 2,4
NC 25 - 12	0,72 ± 0,07	12,0 ± 0,9	0,59 ± 0,72	10,8 ± 9,7
NC 25 - 13	0,40 ± 0,14	12,0 ± 1,4	0,26 ± 0,11	6,3 ± 0,9
NC 25 - 14	0,33 ± 0,03	8,0 ± 0,7	0,56 ± 0,06	8,0 ± 2,4
NC 25 - 15	0,15	4,7	0,40 ± 0,00	11,0 ± 3,8
NC 25 - 16	0,65	9,0	0,38 ± 0,07	11,8 ± 3,5
NC 25 - 17	0,28 ± 0,32	7,5 ± 4,9	0,38 ± 0,08	11,0 ± 0,0
NC 25 - 18	0,24 ± 0,01	6,0 ± 2,8	0,76 ± 0,13	12,3 ± 6,1
NC 25 - 19	0,10 ± 0,05	4,7 ± 0,0	0,23 ± 0,09	3,2 ± 0,7
NC 25 - 20	0,25 ± 0,07	5,2 ± 1,6	0,41 ± 0,58	6,8 ± 9,7
NC 25	0,30 ± 0,07	8,2 ± 1,2	0,48 ± 0,05	9,3 ± 2,8
NC 27 - 1	0,16 ± 0,01	3,5 ± 1,6	0,36 ± 0,22	9,3 ± 9,0
NC 27 - 2	0,28	4,0	0,33 ± 0,28	6,3 ± 3,8
NC 27 - 3	0,12	2,7	0,40 ± 0,09	6,3 ± 3,8
NC 27 - 4	0,17	3,7	0,52 ± 0,02	9,7 ± 1,9
NC 27 - 5	0,05	2,0	0,04 ± 0,01	2,0 ± 0,5
NC 27 - 6	0,28 ± 0,01	2,2 ± 1,6	1,33 ± 0,24	20,8 ± 3,1
NC 27 - 7	0,28	3,2	0,47 ± 0,28	8,0 ± 4,7
NC 27 - 8	0,20 ± 0,14	3,3 ± 1,4	0,80 ± 0,09	9,2 ± 0,7
NC 27 - 9	0,11 ± 0,11	1,7 ± 0,9	1,12 ± 0,26	15,2 ± 4,5
NC 27 - 10	0,09	4,3	0,22 ± 0,02	8,5 ± 1,2
NC 27 - 11	0,37 ± 0,21	5,8 ± 0,2	0,70 ± 0,28	10,2 ± 2,6
NC 27 - 12	0,13	4,3	0,47 ± 0,05	6,8 ± 1,6
NC 27 - 13	0,25	4,7	0,34 ± 0,32	5,3 ± 3,3
NC 27 - 14	0,33 ± 0,28	5,2 ± 0,2	0,33 ± 0,06	4,8 ± 0,2
NC 30 - 1	0,43	3,7	0,57 ± 0,05	9,0 ± 4,7
NC 30 - 2	0,25	4,7	0,73 ± 0,34	6,0 ± 0,5
NC 30 - 3	0,73	7,7	1,23 ± 0,42	18,8 ± 3,5
NC 30 - 4	0,53 ± 0,00	7,7 ± 0,9	0,45 ± 0,16	5,5 ± 2,1
NC 30 - 5	0,13	1,7	0,41 ± 0,34	6,3 ± 3,8
NC 30 - 6	0,28 ± 0,12	8,3 ± 3,8	0,85 ± 0,26	9,3 ± 1,9
NC 30 - 7	0,39 ± 0,11	6,7 ± 1,4	0,49 ± 0,37	9,2 ± 4,9
NC 30 - 8	0,60 ± 0,47	5,5 ± 2,1	1,35 ± 0,64	11,0 ± 2,8
NC 30 - 9	0,12	3,0	0,38 ± 0,08	5,2 ± 1,2
NC 30 - 10	0,38 ± 0,02	4,8 ± 0,7	0,56 ± 0,15	10,0 ± 2,4
NC 30 - 11	0,33 ± 0,09	3,8 ± 1,6	0,72 ± 0,02	7,5 ± 0,2
NC 30 - 12	0,13 ± 0,00	2,0 ± 0,5	0,68 ± 0,53	7,2 ± 4,0
NC 30 - 13	0,73	11,0	0,53 ± 0,28	6,2 ± 1,2
NC 30 - 14	0,42	4,0	1,02 ± 0,07	9,8 ± 1,6
NC 30 - 15	0,42 ± 0,35	5,5 ± 4,0	0,76 ± 0,46	8,0 ± 1,4
NC 30 - 16	0,25 ± 0,21	4,8 ± 5,4	0,48 ± 0,06	5,7 ± 2,4
Media campo	0,37	5,3	0,49	7,6

Allegato 2 - Caratteristiche morfologiche dei tuberi dei cloni NC *Solanum tuberosum* - *Solanum phureja* allevate a Camigliatello Silano nel 2002 e 2003.

Genotipo	Occhi		Stoloni ³	Forma tubero ⁴	Colore	
	Profondità ¹	Colore ²			Buccia ⁵	Pasta ⁶
Atzimba	s		c	t	g	g
Carminc	s	r	c	o	r	g
LC0091	s		c	a	r	g
MC330	s		c	t	g	b
UP88-P5	s		c	t	g	g
I	p	r	c	t	g	b
NC 5 - 2	p	r	c	o	g	g
NC 5 - 3	s	r	c	t	g	g
NC 5 - 4	p		c	t	r	b
NC 5 - 5	s	r	c	t	g	g
NC 5 - 6	s	r	c	o	g	g
NC 5 - 7	s	r	c	t	g	b
NC 5 - 8	p		c	t	g	g
NC 5 - 9	s		c	o	g	g
NC 5 - 10	s	r	c	t	r	g
NC 5 - 12	p	r	c	t	g	g
NC 5 - 13	p	r	c	o	g	g
NC 5 - 14	p	r	c	t	g	g
NC 5 - 15	p	r	c	t	r	g
NC 10 - 1	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 2	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 3	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 4	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 5	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 6	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 7	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 8	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 9	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 10	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 11	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 13	p		c	t	g	b
NC 10 - 14	s		c	t	g	g
NC 10 - 15	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 16	p	r	c	t	g	b
NC 10 - 17	s	r	c	t	g	b
NC 10 - 18	p	r	c	t	g	b
NC 12 - 2	s	r	c	t	g	b
NC 12 - 3	s	r	c	t	g	b
NC 12 - 4	p	r	c	t	g	g
NC 12 - 5	s	r	c	t	g	g
NC 12 - 6	s	r	c	t	g	b
NC 12 - 7	p	r	c	t	g	g
NC 12 - 8	s	r	c	t	g	b
NC 12 - 9	p	r	c	t	g	b
NC 12 - 11	p	r	c	t	g	b
NC 12 - 13	s	r	c	t	g	b
NC 12 - 14	p	r	c	t	g	b
NC 12 - 15	s	r	c	t	g	b
NC 15 - 1	p	r	c	t	g	g
NC 15 - 2	s	r	c	t	g	g

NC 15 - 3	p	r	c	t	g	b
NC 15 - 4	p	r	c	t	g	b
NC 15 - 5	s	r	c	t	g	b
NC 15 - 6	p	r	c	t	g	g
NC 15 - 7	s	r	c	t	g	b
NC 15 - 8	s		c	t	g	b
NC 15 - 9	s	r	c	t	g	b
NC 15 - 10	p	r	c	t	g	g
NC 15 - 11	p	r	c	t	g	b
NC 15 - 12	s	r	c	t	g	g
NC 15 - 13	s	r	c	t	g	g
NC 15 - 15	p	r	c	t	g	g
NC 15 - 16	s	r	c	t	g	b
NC 15 - 17	p		c	o	g	g
NC 15 - 18	p	r	c	t	g	b
NC 18 - 1	p	r	c	t	g	g
NC 18 - 2	p		c	t	g	b
NC 18 - 3	p	r	c	t	g	g
NC 18 - 5	p		c	t	g	b
NC 18 - 6	p		c	o	g	b
NC 18 - 8	p	r	c	t	g	g
NC 18 - 9	p	r	c	t	g	b
NC 18 - 10	s	r	c	t	g	b
NC 18 - 11	p	r	c	t	g	b
NC 18 - 12	p		c	t	g	b
NC 21 - 1	s		c	o	g	g
NC 21 - 2	p	r	c	o	g	g
NC 21 - 3	p	r	i	o	g	g
NC 21 - 4	s		c	o	g	g
NC 21 - 5	s	r	c	t	g	g
NC 21 - 6	s		c	t	g	g
NC 21 - 7	s		c	a	g	g
NC 21 - 8	s	r	c	t	g	g
NC 21 - 9	s	r	c	a	g	g
NC 21 - 10	s	r	c	t	g	g
NC 21 - 11	s	r	c	t	g	g
NC 21 - 12	s		c	o	g	g
NC 21 - 13	s	r	c	t	g	g
NC 21 - 14	p	r	c	t	g	g
NC 21 - 15	p	r	c	t	g	g
NC 21 - 16	p	r	c	t	g	g
NC 21 - 18	p	r	l	o	g	g
NC 21 - 19	s	r	c	t	g	g
NC 23 - 1	s	r	c	o	g	g
NC 23 - 2	s	r	c	o	g	b
NC 23 - 3	s	r	c	o	r	g
NC 23 - 4	s		c	o	r	g
NC 23 - 5	p	r	c	a	r	g
NC 23 - 6	p	r	c	a	r	g
NC 23 - 7	p	r	c	t	g	g
NC 23 - 8	s	r	c	t	g	g
NC 23 - 9	p		c	t	g	g
NC 23 - 10	s	r	c	o	r	g
NC 23 - 11	p	r	c	o	r	g
NC 23 - 12	s	r	c	t	g	g
NC 25 - 1	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 2	p	r	c	t	g	g

NC 25 - 3	p	r	c	a	g	g
NC 25 - 4	p	r	c	t	r	g
NC 25 - 5	s	r	c	t	g	g
NC 25 - 6	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 7	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 8	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 9	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 10	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 11	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 12	s	r	c	t	r	g
NC 25 - 13	p	r	c	t	r	g
NC 25 - 15	p	r	c	t	g	b
NC 25 - 16	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 17	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 18	p	r	c	t	g	g
NC 25 - 19	p	r	c	o	r	g
NC 25 - 20	p		c	t	g	b
NC 25	p	r	c	t	g	g
NC 27 - 1	p	r	c	o	g	g
NC 27 - 2	p	r	c	o	g	g
NC 27 - 3	p	r	c	t	g	g
NC 27 - 4	p	r	c	o	g	g
NC 27 - 5	s	r	c	a	g	g
NC 27 - 6	p	r	c	a	g	g
NC 27 - 7	s	r	c	o	g	g
NC 27 - 8	p	r	c	o	g	g
NC 27 - 9	s	r	c	t	g	g
NC 27 - 10	p	r	c	t	g	g
NC 27 - 11	s	r	c	a		g
NC 27 - 12	p		c	t	g	g
NC 27 - 13	p	r	c	t	g	g
NC 27 - 14	p	r	c	t	g	g
NC 30 - 1	s	r	c	t	g	g
NC 30 - 2	p	r	c	o	g	g
NC 30 - 3	s	r	c	o	g	g
NC 30 - 4	p	r	c	a	g	g
NC 30 - 5	s	r	c	o	g	g
NC 30 - 6	s	r	l	o	g	g
NC 30 - 7	s	r	c	o	g	g
NC 30 - 8	p	r	l	t	g	g
NC 30 - 9	p	r	l	o	g	g
NC 30 - 10	s	r	c	o	g	g
NC 30 - 11	s	r	c	t	g	g
NC 30 - 12	p		c	o	g	g
NC 30 - 13	s	r	c	t	g	g
NC 30 - 14	s	r	c	a	g	g
NC 30 - 15	p	r	c	o	g	g
NC 30 - 16	p	r	l	o	g	g

¹ s = superficiali; p = profondi

² r = rosso

³ l = lunghi; c = corti

⁴ t = tonda; o = ovale; a = allungata

⁵ r = rossa; g = gialla

⁶ g = gialla; b = bianca

Allegato 3 - Caratteristiche produttive e qualitative dei cloni MCPH *Solanum tuberosum*-*Solanum commersonii* selezionati.

Clone	Resistenza			vitamina C ^d	Produzione ^e	% bande AFLP-cmm	Peso specifico	occhi ^f	colore ^g			stoloni ^h	forma ⁱ
	<i>R. solanacearum</i> ^a	<i>P. infestans</i> ^b	<i>E. carotovora</i> ^c						buccia	pasta			
MCPH 19	0,6	-	6,1	35%	0,26	16%	1,1108	m	g	b		m	o
MCPH 16	2,1	26,8	3,9	18%	0,35	18%	1,1145	m	g	b		c	o
MCPH 21	0,6	-	3,2	15%	0,20	40%	1,1092	m	g	b		m	o
MCPH 31	0,6	23,3	5,9	10%	0,25	21%	1,1070	m	g	b		l	o
MCPH 11	1,5	33,2	5,3	20%	0,65	21%	1,1030	m p	g	b		l	t

^a Indice di malattia al 20° giorno da 0 a 5

^b Resistenza espressa come dimensione (mm) del diametro della lesione delle foglie dopo inoculo artificiale con il fungo

^c Resistenza espressa come dimensione (mm) del diametro della lesione del tubero dopo inoculo artificiale con il batterio

^d Valori espressi in percentuale rispetto al valore medio riportato dai parentali *S. tuberosum*

^e Media nel biennio espressa in kg pt⁻¹

^f m=mediamente profondi; m p= molto profondi.

^g g=giallo; b=bianco

^h c=corti; l= lunghi; m=media lunghezza

ⁱ o = ovale; t=tonda

Allegato 4 - Caratteristiche produttive e qualitative dei cloni NC *Solanum tuberosum* - *Solanum phureja* selezionati.

Clone	Resistenza a		Produzione ^c	Occhi ^d	colore ^e			stoloni ^f	forma ^g
	<i>E. carotovora</i> ^a	vitamina C ^b			occhi	buccia	pasta		
NC 30 - 16	2,0	211%	0,36	p	r	g	g	l	o
NC 12 - 3	2,0	54%	0,22	s	r	g	b	c	t
NC 10 - 5	3,0	66%	0,77	p	r	g	b	c	t
NC 21 - 15	8	181%	1,20	p	r	g	g	c	t
NC 30 - 3	3,3	229%	0,98	s	r	g	g	c	o
NC 30 - 8	7,8	96%	0,98	p	r	g	g	l	o

^a Resistenza espressa come dimensione (mm) del diametro della lesione dopo inoculo artificiale con il batterio

^b Valori espressi in percentuale rispetto al valore medio di Spunta

^c Media nel biennio espressa in kg pt⁻¹

^d p=profondi; s=superficiali.

^e r=rossi; g=giallo; b=bianco

^f c=corti; l= lunghi

^g o = ovale; t=tonda.

8. Bibliografia

1. Adiwilaga KD, e Brown CR. **1991**. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool. *Theor. Appl. Genet.* 81:645-652.
2. Bani-Aameur F, Lauer FI, Veilleux RE e Hilali A. **1991**. Genomic composition of 4x-2x potato hybrids: influence of *Solanum chacoense*. *Genome* 34:413-420.
3. Barba-Gonzalez R, Lokker AC, Lim KB, Ramanna MS e Van Tuyl JM. **2004**. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental × Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). *Theor. Appl. Genet.* 109:1125-1132.
4. Barcaccia G, Rosellini D, Falcinelli M e Veronesi M. **1998**. Reproductive behaviour of tetraploid alfalfa plants obtained by unilateral and bilateral sexual polyploidization. *Euphytica* 99:199-203.
5. Barone A. **2004**. Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Am. Potato J.* 81:111-117.
6. Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, e Molina A. **2002**. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 128:951-961.
7. Bradshaw JE e Mackay GR. **1994**. Breeding strategies for clonally propagated potatoes. p. 467-497. In J.E. Bradshaw and G.R. Mackay (ed.) *Potato Genetics*.
8. Bretagnolle F e Thompson JD. **1995** Gametes with the somatic chromosome number: mechanism of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 129:1-22.
9. Buso JA, Aragão FAS, Reifschneider FJB, Boiteux LS e Peloni JS. **2002**. Assessment under short-day conditions of genetic material derived from three potato breeding strategies: 4x-4x (intra-Tuberosum), 4x-2x (FDR 2n-pollen), and 4x-4x (diplandrous tetraploid). *Euphytica* 126:437-446.

10. Buso JA, Boiteux LS, Tai GC e Peloquin JS. **1999a**. Chromosome regions between centromeres and proximal crossovers are the physical sites of major effect loci for yield in potato: Genetic analysis employing meiotic mutants. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1773-1778.
11. Buso JA, Reifschneider FJB, Boiteux LS, e Peloquin SJ. **1999b**. Effects of 2n-pollen formation by first meiotic division restitution with and without crossover on eight quantitative traits in 4x-2x potato progenies. *Theor. Appl. Genet.* 98:1311-1319.
12. Buso JA, Boiteux LS, e Peloquin JS. **1999c**. Comparison of haploid *Tuberosum* - *Solanum chacoense* vs. *S. phureja* - haploid *Tuberosum* hybrids as staminate parent of 4x - 2x progenies evaluated under distinct crop management systems. *Euphytica* 109:191-199.
13. Buso JA, Boiteux LS e Peloquin JS. **1999d**. Evaluation under long-day condition of 4x-2x progenies from crosses between potato cultivars and haploid *Tuberosum-Solanum chacoense* hybrids. *Ann. Appl. Biol.* 135:35-40.
14. Camadro EL, Carputo D e Peloquin JS. **2004**. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 109:1369-1376.
15. Camadro EL e Espinillo JC. **1990**. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. using 2n eggs. *Am. Potato J.* 67:737-749.
16. Carputo D e Barone A. **2005**. Ploidy manipulation in potato through sexual hybridization. *Ann. Appl. Biology* 146:71-79.
17. Carputo D, Terra A, Barone A, Esposito F, Fogliano V, Monti L e Frusciante L. **2003**. Glycoalkaloids and acclimation capacity of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent hard species *Solanum commersonii* *Theor. Appl. Genet.* 107:1187-1194.

18. Carputo D, Frusciante L, Monti L, Parisi M e Barone A. **2002**. Tuber quality and soft rot resistance of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent wild relative *S. commersonii*. *Am. Potato J.* 79:345-352.
19. Carputo D, Basile B, Cardi T e Frusciante L. **2000**. *Erwinia* resistance in backcross progenies of *Solanum tuberosum* x *Solanum tarijense* and *Solanum tuberosum*(+)*Solanum commersonii* hybrids. *Potato R.* 43:135-142.
20. Carputo D, Barone A, Cardi T, Sebastiano A, Frusciante L e Peloquin JS. **1997**. Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12013-12017.
21. Carputo D, Barone A, Consoli D e Frusciante L. **1994**. Use of seedling tubers from TPS in Southern Italy. *Am. Potato J.* 71:29-38.
22. Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Alvarez B, Lopez MM e Biosca EG. **2005**. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:140-148.
23. Ciampi L e Sequeira L. **1980**. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Ralstonia solanacearum*. *Am. Potato J.* 57, 307-317.
24. Collmer A e Keen NT. **1986**. The role of pectic enzyme in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopat.* 24:383-409.
25. Costanzo S, Simko I, Christ BJ e Haynes KG. **2005**. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* x *S. stenotomum*. *Theor. Appl. Genet.* 111:609 - 617
26. Culley DE, Dean BB e Brown CR. **2002**. Introgression of the low browning trait from the wild Mexican species *Solanum hjertingii* into cultivated potato (*S. tuberosum* L.). *Euphytica* 125:293-303.

27. Davies CS, Ottman JM, e Peloquin JS. **2002**. Can germplasm resources be used to increase the ascorbic acid content of stored potatoes? *Am. Potato J.* 79:295-299
28. Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M e Marco Y. **1998**. Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:659-667.
29. Ehlenfeldt MK e Hanneman RE. **1988**. The transfer of the synaptic gene (*sy-2*) from 1 EBN *Solanum commersonii* Dun. to 2 EBN germplasm. *Euphytica* 37:181-187.
30. Ehlenfeldt MK e Hanneman RE Jr. **1984**. The use of Endosperm Balance Number and 2n gametes to transfer exotic germplasm in potato. *Theor. Appl. Genet.* 68:155-161.
31. Esposito F, Fogliano V, Cardi T, Carputo D e Flippone E. **2002**. Glycoalkaloid content and chemical composition of potatoes improved with nonconventional breeding approaches. *J. Agric. Food Chem.* 50:1553-1561.
32. Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G e Sihachakr D. **2000**. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Sci.* 160:165-176.
33. Franceschi VR e Tarlyn NM. **2002**. L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol.* 130:649-656.
34. French ER, Anguiz R e Aley FP **1998**. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the integrated control of bacterial wilt. p. 381-385. In Prior P, Allen C e Elphinstone J (ed.) *Bacterial Wilt Disease, Molecular and Ecological Aspects*.

35. Frusciante L, Barone A, Carputo D, e Ranalli S. **1999**. Breeding and physiological aspects of potato cultivation in the mediterranean region. *Potato R.* 42:265-277.
36. Gebhardt C e Valkonen JP. **2001**. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopatl.* 39:79-102.
37. Hamalainen JH, Watanabe KN, Valkonen JPT, Arihara A, Plaisted RL, Pehu E, Miller L e Slack SA. **1997**. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* 94:192-197.
38. Hancock RD, McRae D, Haupt S e Viola R. **2003**. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol* 3:7.
39. Hancock RD, Galpin JR, e Viola R. **2000**. Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 186:245-250.
40. Hanneman RE Jr, e Bamberg JB. **1986**. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. *Wis. Agric. Exp. Stn. Bull.*
41. Hayes RJ, e Thill CA. **2002**. Selection for potato genotypes from diverse progenies that combine 4°C chipping with acceptable yields, specific gravity, and tuber appearance. *Crop Sci.* 42:1343-1349.
42. Hayward AC. **2000**. *Ralstonia solanacearum*. p. 32-42. In J. Lederberg (ed.) *Academic Press*.
43. Hayward AC. **1991**. Biology and epidemiology of a bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopat.* 29:65-87.
44. Iovene M, Barone A, Frusciante L, Monti L e Carputo D. **2004**. Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome content and resistance traits from *Solanum commersonii*. *Theor. Appl. Genet.* 109:1139-1146.
45. Janssen GJW, Van Norel A, Verkernk-Bakker B, Janssen R e Hoogen-Doorn J. **1997**. Introgression of resistance to root-

knot nematodes from wild Central American *Solanum* species into *S. tuberosum* spp. *tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 95:490-496.

46. Johnston SA e Hanneman RE. **1995**. The genetics of triploid formation and its relationship to endosperm balance number in potato. *Genome* 38:60-67.
47. Johnston SA, Den Nijs TPM, Peloquin JS e Hanneman RE Jr. **1980**. The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 57:5-9.
48. Kim-Lee H, Moon JS, Hong YJ, Kim MS e Cho HM. **2005**. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am. Potato J.* 82, 129-137.
49. Kuhl JC, Hanneman RE Jr e Havey MJ. **2001**. Characterization and mapping of Rpi1, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol. Genet. Genomics* 265:977-985.
50. Laferriere LT, Helgeson JP e Allen C. **1999**. Fertile *Solanum tuberosum*(+)*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1272-1278.
51. Lee SK e Kader AA. **2000**. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* 20:207-220.
52. Levine M, Wang Y, Padayatty SJ e Morrow J. **2001**. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9842-9846.
53. Louwes KM, Hoekstra R e Matthei WM. **1992**. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and wild species *S. circaeflium* subsp. *circaelifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestance* (Mont.) de Bary and Globodera. *Theor. Appl. Genet.* 84:363-370.

54. Marczewski, Hennig e Gebhardt C. **2002**. The potato virus S resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII. *Theor. Appl. Genet.* 105:564-567.
55. Martin C. **1979**. Sources of resistance to *Pseudomonas solanacearum*, developments in control of potato bacterial disease. *Report of a Planning Conference held at CIP.* 49-53. Lima, Peru.
56. Mok DWS e Peloquin JS. **1975**. The inheritance of three mechanisms of diploandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity* 35:295-302.
57. Oberhagemann P, Chatot-Balandras C, Schafer-Preg R, Wegener D, Palomino C, Salamini F, Bonnel E e Gebhardt C. **1999**. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. *Mol. Breed.* 5:399-415.
58. Ortiz R. **1998**. Potato breeding via ploidy manipulation. *Plant Breeding Rev.* 16:15-86.
59. Ortiz R, Franco J e Iwanaga I. **1997**. Transfer of resistance to potato cyst nematode (*Globodera pallida*) into cultivated potato *Solanum tuberosum* through first division restitution 2n pollen. *Euphytica* 96:339-344.
60. Ortiz R, Iwanaga M e Peloquin JS. **1994**. Breeding potatoes for developing countries using wild tuber bearing *Solanum* spp. and ploidy manipulation. *J. Genet. & Breed.* 48:89-98
61. Pavek JJ e Corsini DL. **2001**. Utilization of potato genetic resources in variety development. *Am. Potato J.* 78: 433-441.
62. Peloquin JS, Boiteux LS e Carputo D. **1999**. Meiotic mutants in potato: valuable variants. *Genetics* 153:1493-1499.
63. Pérombelon MCM. **2002**. Potato disease caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pat.* 51:1-12.
64. Ross H. **1986**. In: Verlag Paul Parey, (eds) Potato breeding - problems and perspectives. Berlin and Hamburg pp 133

65. Tai GCC e Jong HD. **1997**. A comparison of performance of tetraploid progenies produced by diploid and their vegetatively doubled (tetraploid) counterpart parents. *Theor. Appl. Genet.* 94:303-308.
66. Tai GCC e Young DA **1984**. Early generation selection for important agronomic characteristic in a potato breeding population. *Am. Potato J.* 61:419-434.
67. Tanksley SD, Young ND, Paterson AH e Bonierbale MW. **1989**. RFLP mapping in plant breeding: new tool for an old science. *BioTechnology* 7, 257-264.
68. Tarn TR, Tai GCC, De Jong H, Murphy AM e Seabrook JEA. **1992**. Breeding potatoes for long-day, temperature climate. John Wiley & Son, New York.
69. Tek AL, Stevenson WR, Helgeson JP e Jiang J. **2004**. Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 109:249-254.
70. Thot IK, Bell KS, Holova MC e Birch PRJ. **2003**. Soft rot erwiniae: from gene to genomes. *Mol. Plant Pathol.* 4:17-30.
71. Tung PX. Genetic variation for bacterial wilt resistance in a population of tetraploid potato. *Euphytica* 61, 73-80. 1992.
72. Valkonen JPT e Rokka VM. **1998**. Combination and expression of two virus resistance mechanisms in interspecific somatic hybrids of potato. *Plant Sci.* 131:85-94.
73. Vasse J, Frey P e Trigalet A. **1995**. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:241-251.
74. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J e Kuiper M. **1995**. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

75. Mattheij WM, Eijlander K, De Koning JRA e Louwes KM. **1992**. Interspecific hybridization between the cultivated potato (*Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaefolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. *Theor. Appl. Genet.* 83:459-466.
76. Villamon FG, Spooner DM, Orrillo M, Mihovilovich E, Pérez W e Bonierbale. **2005**. Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species *Solanum paucisectum* (series *Piurana*). *Theor. Appl. Genet.* in stampa
77. Watanabe K, El-Nashar H e Iwanaga M. **1992**. Transmission of bacterial wilt resistance by FDR 2n pollen via 4x - 2x crosses in potatoes. *Euphytica* 60:21-26.
78. Werner JE, e Peloquin JS. **1990**. Frequency and mechanisms of 2n egg formation in haploid *tuberosum*-wild species F₁ hybrids. *Am. Potato J.* 64:641-654.
79. Yi JY, Seo HW, Yang MS, Robb EJ, Nazar RN e Lee SW. **2004**. Plant defense gene promoter enhances the reliability of shiva-1 gene-induced resistance to soft rot disease in potato. *Planta* 220:165-171.
80. Zimnoch-Guzowska E, Marczewski W, Lebecka R, Flis B, Schafer-Pregl R, Salamini F e Gebhardt C. **2000**. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci.* 40:1156-1167.